

---

# **Isolierung und Charakterisierung hochaffiner Cystin-knoten-basierter Matriptase-1 Inhibitoren**

---



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Bernhard Glotzbach  
aus Suhl

Referent:	Prof. Dr. H. Kolmar
Korreferent:	Prof. Dr. S. Neumann
Tag der Einreichung	07.05.2013
Tag der mündlichen Prüfung	19.06.2013

Darmstadt 2013

D17

---

---

## I. Publikationsliste:

1. Hofmeyer, T., Bulani, S. I., Grzeschik, J., Krah, S., Glotzbach, B., Uth, C., Avrutina, O., Brecht, M., Göringer, H. U., van Zyl, P., Kolmar, H. (2013). Protein Production in *Yarrowia lipolytica* via Fusion to the Secreted Lipase Lip2p. *Mol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s12033-013-9684-2.
2. Glotzbach, B., Reinwarth, M., Weber, N., Fabritz, S., Tomaszowski, M., Fittler, H.; Christmann, A., Avrutina, O., Kolmar, H. (2013). Combinatorial optimization of cystine-knot peptides towards high-affinity inhibitors of human matriptase-1. *PLoS One*: submitted.
3. Fittler, H., Avrutina, O., Glotzbach, B., Empting, M., Kolmar, H. (2013). Combinatorial tuning of peptidic drug candidates: high-affinity matriptase inhibitors through incremental structure-guided optimization. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 1848-57.
4. Glotzbach, B., Schmelz, S., Reinwarth, M., Christmann, A., Heinz, D. W. & Kolmar, H. (2013). Structural characterization of *Spinacia oleracea* trypsin inhibitor III (SOTI-III). *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **69**, 114-120.
5. Reinwarth, M., Glotzbach, B., Tomaszowski, M., Fabritz, S., Avrutina, O. & Kolmar, H. (2013). Oxidative folding of peptides with cystine-knot architectures: kinetic studies and optimization of folding conditions. *ChemBioChem* **14**, 137-146.
6. Avrutina, O., Fittler, H., Glotzbach, B., Kolmar, H. & Empting, M. (2012). Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redox-stable SFTI-1 variants at near physiological pH. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 7753-7762.
7. Fabritz, S., Hörner, S., Könnig, D., Empting, M., Reinwarth, M., Dietz, C., Glotzbach, B., Frauendorf, H., Kolmar, H., Avrutina, O. (2012). From pico to nano: biofunctionalization of cube-octameric silsesquioxanes by peptides and miniproteins. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6287-6293.

## Patentanmeldungen in Kooperation mit Merck KGaA:

8. Fittler, H., Empting, M., Glotzbach, B., Kolmar, H. (2013). High-affinity matriptase inhibitors. EP13000310.6.
9. Glotzbach, B., Weber, N., Tomaszowski, M., Hock, B., Kolmar, H. (2013). Potent inhibitors of human matriptase derived from MCoTI-II Variants. EP13001869.0



*"A man who dares to waste one hour of time  
has not discovered the value of life."*

(Charles R. Darwin)

---

## II. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Typ II transmembrane Serinproteasen (TTSPs) .....	2
1.1.1	<i>Matriptase-1 – Biomarker &amp; regulatorische Schnittstelle</i> .....	4
1.2	Serinproteaseinhibitoren (SPIs) – Schalter proteolytischer Aktivität .....	7
1.3	Protein Engineering .....	9
1.3.1	<i>Rationales Proteindesign</i> .....	10
1.3.2	<i>Evolutives Proteindesign (Directed Evolution)</i> .....	11
1.3.3	<i>Yeast Surface Display</i> .....	13
1.3.4	<i>Cystinknoten – einzigartige scaffold-Strukturen</i> .....	14
1.4	Zielsetzung .....	16
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>17</b>
2.1	Bakterien-, Hefestämme und verwendete humane Zelllinien .....	17
2.2	Plasmide .....	17
2.2.1	<i>pET42dest His-Matriptase (cd) 596-855</i> .....	17
2.2.2	<i>pCT-EGFR</i> .....	18
2.2.3	<i>pCT-Trx-VHH</i> .....	20
2.2.4	<i>pCT-SOTI-III-wt</i> .....	21
2.3	DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker .....	22
2.4	Oligodesoxyribonukleotide .....	23
2.5	Antikörper, Enzyme und Proteine .....	24
2.6	Chemikalien .....	25
2.7	Sonstige Materialien und Geräte .....	28
2.8	Nährmedien .....	31
2.9	Lösungen und Puffer .....	33
2.10	Kits .....	37
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>38</b>
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden .....	38
3.1.1	<i>Vorbereitung von Geräten und Lösungen</i> .....	38
3.1.2	<i>Bestimmung der Zelldichte</i> .....	38
3.1.3	<i>Stammhaltung und Kultivierung von Escherichia coli</i> .....	38
3.1.4	<i>Transformation von Escherichia coli durch Elektroporation</i> .....	39
3.1.5	<i>Stammhaltung und Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae</i> .....	39
3.1.6	<i>Induktion plasmid- und chromosomalkodierter Genexpression in S. cerevisiae</i> .....	40
3.1.7	<i>Transformation von S. cerevisiae durch Elektroporation</i> .....	40
3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	42
3.2.1	<i>DNA-Präzipitation aus wässrigen Lösungen durch Ethanol</i> .....	42
3.2.2	<i>Reinigung von DNA-Lösungen mittels Phenol/Chloroform Extraktion</i> .....	42
3.2.3	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	42
3.2.4	<i>Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen</i> .....	43
3.2.5	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i> .....	43



3.2.5.1	Analytische und semi-präparative Extraktion von Plasmid-DNA.....	43
3.2.5.2	Präparative Extraktion und Reinigung von Plasmid-DNA.....	44
3.2.6	Isolierung von Plasmid- sowie chromosomaler-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	45
3.2.7	Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen.....	45
3.2.8	Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation .....	46
3.2.9	Hochdurchsatz Amplicon Sequenzierung – 454-Sequenzierung.....	46
3.3	Enzymatische Manipulation von DNA.....	47
3.3.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	47
3.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	47
3.3.3	Kolonie-PCR von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	48
3.4	Proteinchemische Arbeitsmethoden .....	49
3.4.1	Expression humaner Matriptase-1 (MT-SP1) in <i>E. coli</i> .....	49
3.4.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> mittels French-Press®.....	49
3.4.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
3.4.4	Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot) .....	50
3.4.5	Konzentrationsbestimmung und Lagerung von Proteinlösungen.....	51
3.4.6	Dialyse .....	51
3.4.7	Biotinylierung von Proteinen .....	51
3.4.8	Fmoc basierte Festphasenpeptidsynthese (SPPS) .....	52
3.4.9	Oxidative Faltung der chemisch synthetisierten Miniproteine .....	53
3.4.10	Reinigung von Proteinen mittels Chromatographie .....	53
3.4.10.1	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	53
3.4.10.2	Ionenaustauschchromatographie.....	54
3.4.10.3	Gelfiltrationschromatographie (GFC).....	55
3.4.10.4	RP-HPLC .....	55
3.4.11	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen mittels LC-MS.....	55
3.4.12	Lagern und lyophilisieren von Proteinen und Proteinlösungen.....	56
3.5	Biochemische Arbeitsmethoden.....	56
3.5.1	Activ-site Titration von Serinproteasen.....	56
3.5.2	Bestimmung der aktiven Inhibitorkonzentration hoch affiner Proteaseinhibitoren.....	57
3.5.3	Bestimmung der Inhibitionskonstante hochaffiner Proteaseinhibitoren.....	58
3.5.4	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von Proteinen .....	58
3.6	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	59
3.6.1	Immunofluoreszenzmarkierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	59
3.6.2	Markierung von <i>S. cerevisiae</i> mit biotinylierten Proteasen .....	59
3.6.3	Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	60
3.7	Arbeiten in der Zellkultur .....	61
3.7.1	Kultivierung adhärent wachsender eukaryotischer Zelllinien.....	61
3.7.2	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	61
3.7.3	Kryokonservierung und Revitalisierung humaner Zelllinien.....	62
3.7.4	IC <sub>50</sub> Bestimmung von Matriptase-1 Inhibitoren in vivo .....	62
4	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>64</b>
4.1	Grundlagenexperimente der Präsentation von SOTI-III auf <i>S. cerevisiae</i> .....	64
4.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren pCT-SOTI-III-wt & pCT-SOTI-III-R32A .....	64
4.1.2	Untersuchung der funktionellen Expression von SOTI-III wt und SOTI-III-R29A auf der Oberfläche von <i>S. cerevisiae</i> .....	67

4.1.3	<i>Diskussion</i> .....	69
4.2	Strukturaufklärung des Cystinknotens SOTI-III.....	70
4.2.1	<i>SPPS und Faltung von SOTI-III wt sowie der Alaninmutante F14A</i> .....	70
4.2.2	<i>Kristallisation und Strukturaufklärung des Miniproteins SOTI-III</i> .....	71
4.2.3	<i>Biochemische Charakterisierung der Inhibitorvarianten</i> .....	74
4.2.4	<i>Vergleich und Klassifizierung des Trypsininhibitors SOTI-III</i> .....	75
4.2.5	<i>Diskussion</i> .....	76
4.3	Erzeugung und Charakterisierung von Miniproteinvariantenbibliotheken auf Basis von MCoTI-II und SOTI-III.....	79
4.3.1	<i>Strukturbasiertes Design der Miniproteinbibliotheken auf Basis von SOTI-III und MCoTI-II</i> .....	79
4.3.1.1	Design der SOTI-III-Bibliothek.....	79
4.3.1.2	Design der MCoTI(SloI)-Bibliotheken .....	80
4.3.2	<i>Generierung und Charakterisierung der Miniproteinbibliotheken</i> .....	82
4.3.2.1	Produktion und Reinigung des pCT-Vektorfragmentes.....	82
4.3.2.2	Erstellung der SOTI-III-Bibliothek.....	83
4.3.2.3	Charakterisierung der SOTI-III-Bibliothek mittels 454-Sequenzierung.....	84
4.3.2.4	Charakterisierung der MCoTI(SloI)-Bibliothek .....	86
4.3.2.5	Erstellung der MCoTI-Bibliotheken .....	87
4.3.3	<i>Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin und Charakterisierung der isolierten SOTI-III Varianten</i> .....	88
4.3.3.1	Selektion der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin aus Rinderpankreas.....	88
4.3.3.2	Charakterisierung der Bindungseigenschaften trypsinbindender SOTI-III Varianten .....	91
4.3.3.3	Sequenzierung der auf Trypsin selektierten SOTI-III Varianten .....	92
4.3.3.4	Synthese und biochemische Charakterisierung des SOTI-III R3 EK4 .....	95
4.3.4	<i>Diskussion</i> .....	96
4.4	Isolierung und Charakterisierung neuer Inhibitoren der humanen Matriptase-1 auf Basis von MCoTI-II und SOTI-III .....	98
4.4.1	<i>Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung humaner Matriptase-1</i> .....	98
4.4.2	<i>Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf Matriptase-1</i> .....	101
4.4.2.1	Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek .....	101
4.4.2.2	Bindungsstudie und Sequenzierung selektierter Einzelklone der SOTI-III-Bibliothek.....	103
4.4.3	<i>Durchmusterung der MCoTI-II Bibliothek auf Matriptase-1</i> .....	107
4.4.3.1	Durchmusterung der MCoTI(SloI)-Bibliothek.....	107
4.4.3.2	Bindungsstudien und Sequenzierungen ausgewählter auf Matriptase-1 selektierter Einzelklone der MCoTI(SloI)-Bibliothek.....	109
4.4.4	<i>Synthese und biochemische Charakterisierung selektierter Matriptase-1 Inhibitoren</i> .....	111
4.4.4.1	Synthese, Faltung und Reinigung ausgewählter Matriptasebinder.....	112
4.4.4.2	Biochemische Charakterisierung der isolierten Inhibitoren .....	113
4.4.4.3	Dosis-Wirkungs-Studie ausgewählter Matriptase-1 Inhibitoren auf humanen Pankreaskrebszellen.....	116
4.4.5	<i>Diskussion</i> .....	118
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	122
6	<b>ANHANG</b> .....	123
7	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	124
8	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	126

---

## 1 Einleitung

Eine der grundlegenden Eigenschaften von Lebewesen ist die Fähigkeit mit ihrer Umwelt zu interagieren. Bereits die unterste Organisationsstufe des Lebens in Form einzelner Zellen (lateinisch; *cellula*, kleine Kammer) tritt als eigenständiges abgegrenztes System aktiv mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung. Den hierfür essentiellen biologischen Prozessen liegt die Notwendigkeit der Regulation zu Grunde.

Durch Makromoleküle wie z. B. Proteine können Stoffe in die Umgebung abgegeben, aufgenommen oder modifiziert werden. So transportieren Ionenkanäle beispielsweise selektiv Ionen durch Membranen und sind somit essentiell für die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen sowie den Erhalt der Zellhomöostase.<sup>1,2</sup> Des Weiteren können externe Stimuli durch cytosolische, membranständige oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zur Signaltransduktion inner- sowie außerhalb der Zelle führen. Durch die Bindung eines Liganden erfolgt beispielsweise eine Konformationsänderung des Rezeptors oder die G-Protein-gekoppelte Freisetzung eines *second messengers* wodurch eine Signalweiterleitung indiziert wird.<sup>3-5</sup> Enzym-gekoppelte Signalwege stellen eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion da. So aktivieren beispielsweise Rezeptor-gekoppelte Kinasen verschiedenste Signalwege (MAPK, PI3K, JAK-STAT) und sind Regulatoren für Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose.<sup>6,7</sup>

Neben der Aktivierung eines Reporters durch Phosphorylierung kann diese ebenfalls durch proteolytische Modifikation erfolgen. Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) liegen auf der Oberfläche verschiedenster Gewebe und Zellen<sup>8</sup> vor und treten speziell im vaskulären System auf der Oberfläche von Blutplättchen, den meisten Leukozyten, dem vaskulären Epithel, Kardiomyocyten sowie in Herz- und Blutgefäße eingelagerten Nerven auf.<sup>9-13</sup> PARs sind wichtige Regulatoren in Prozessen der Koagulation, Homöostase sowie Inflammation und stehen mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung.<sup>14-16</sup> Neben der Aktivierung von Rezeptoren spielen Proteasen ebenfalls Schlüsselrollen in Prozessen der Proteindegradierung, der Pathogenabwehr, der Wundheilung, dem Abbau falschgefalteter Proteine, der Enzymaktivierung und -regulation sowie bei einer Vielzahl anderer Prozesse.<sup>17-19</sup> Proteolytische Enzyme werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und funktionellen Aminosäurereste im aktiven Zentrum grundsätzlich in die Klassen der Aspartyl-, Cystein-, Metallo-, Serin- und Threonylproteasen untergliedert.<sup>20</sup> Aufgrund ihrer

---

diversen Funktionen und Einflüsse auf verschiedenste Signalkaskaden werden Proteasen spezifisch reguliert. Prinzipiell erfolgt dies anhand der Expression inaktiver Vorstufen<sup>21</sup> oder durch Inhibition.<sup>22,23</sup> Hierbei wird das aktive Zentrum des proteolytischen Enzyms durch Proteine, Peptide oder andere Verbindungen blockiert. Veränderungen der relativen Verhältnisse von Protease und dem entsprechenden Inhibitor stehen häufig in Verbindung mit Krebs, was eine Beziehung von proteolytischer Dyseglulierung verschiedenster Prozesse und malignen Zellwachstum nahe legt.<sup>24-26</sup> Studien des letzten Jahrzehnts belegen außerdem, dass das verstärkte Auftreten einer Unterklasse der Serinproteasen, der Typ II transmembranen Serinproteasen (TTSPs), auf der Krebszelloberfläche einen Marker verschiedener Tumore darstellt.<sup>27,28</sup>

### ***1.1 Typ II transmembrane Serinproteasen (TTSPs)***

TTSPs sind eine große Unterfamilie der membranständigen Serinproteasen und auf unterschiedliche Art und Weise in der Membran verankert. Sie können durch eine C-terminale transmembrane Domäne (Typ I,  $\gamma$ 1-Tryptase),<sup>29</sup> eine carboxy-terminale hydrophobe Region (Testisin<sup>30</sup>, Prostasin<sup>31</sup>)<sup>32</sup>, die als Signal für ein membran-assoziiertes Glycosylphosphatidylinositol (GPI-Anker) fungiert, oder durch einen N-terminale transmembrane Domäne (Typ II oder TTSP)<sup>27</sup> in der Membran befestigt sein.<sup>33-35</sup> Zu der Familie der TTSPs gehören 17 humane Enzyme, die sich nochmals in die Matriptase-, Corin-, Hepsin/TMPRSS2- und HAT/DESC-Unterfamilie (Abb. 1.1) untergliedern.<sup>26,35</sup> Alle Proteasen dieser Unterfamilien sind durch eine N-terminale transmembrane Domäne in der Membran verankert und weisen neben einer zentralen variablen Region eine C-terminale katalytische Serinprotease Domäne (SPD) auf. Diese wiederum zeigen ein Faltungsmotiv des Chymotrypsin-(S1)-Typs. TTSPs werden als inaktive Zymogene exprimiert und proteolytisch aktiviert.<sup>26</sup> Nach Aktivierung der Protease verbleibt die katalytische Domäne durch Ausbildung einer Disulfidbrücke mit der Prodomäne membranassoziiert.<sup>36</sup> Mit Hilfe der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne interagieren TTSPs mit dem Cytoskelett und zellulären Signalmolekülen. Die Multidomänenstruktur dieser membranständigen Proteasen ermöglicht wahrscheinlich die Ausbildung von Signalkomplexen mit Molekülen verschiedenster Funktion.<sup>36</sup> Des Weiteren vermittelt die variable Stammregion (Abb. 1.1) verschiedenste Prozesse wie z. B. die Aufnahme von Makromolekülen sowie Protein-Protein Interaktionen.

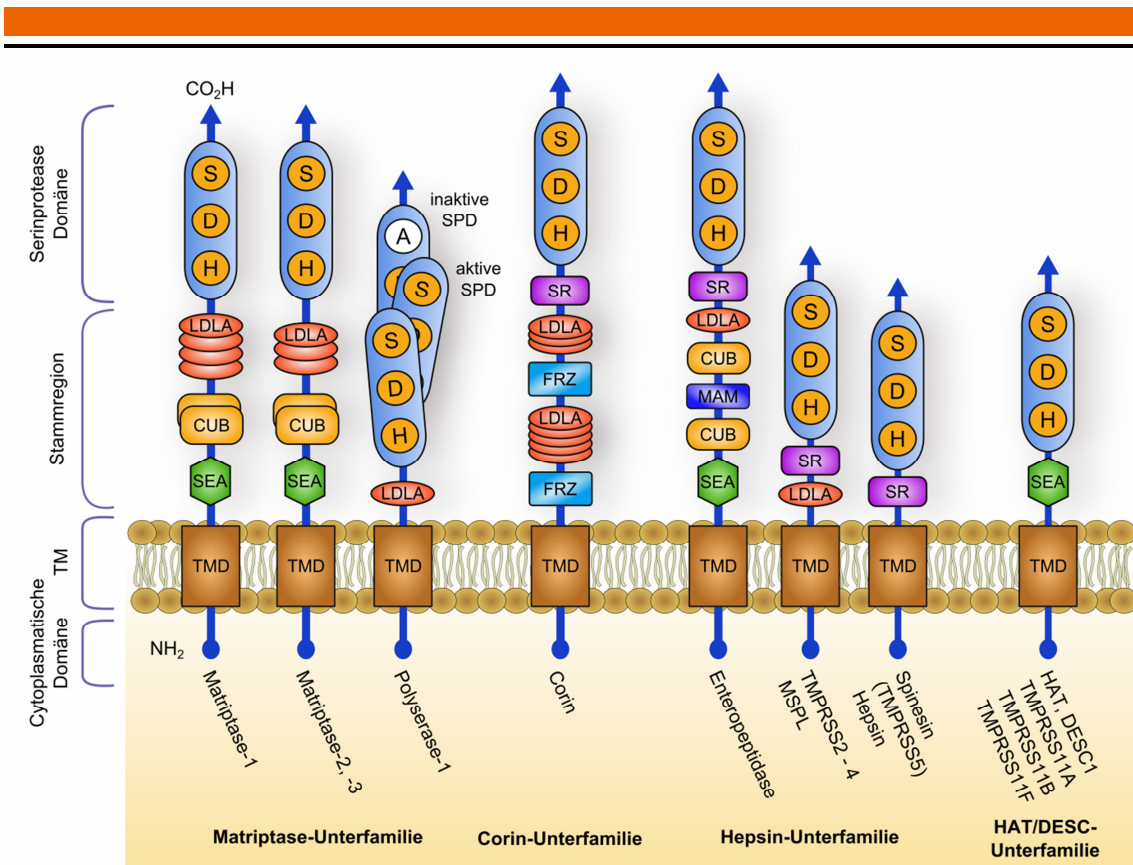


Abb. 1.1: Multidomänen Darstellung der Struktur humaner TTSPs. Sie werden aufgrund von Struktur und Sequenzhomologien in vier Unterfamilien gegliedert (Matriptase-, Corin-, Hepsin-, HAT/DESC-Familie). Alle Domänen wurden mit entsprechenden Abkürzungen gekennzeichnet: CUB – Cts/Clr, *urchin embryonic growth factor* und *bone morphogenic protein-1* Domäne; FRZ – *frizzled* Domäne; LDLA – *low-density lipoprotein receptor domain class A*; MAM – *a merpin*, A5 antigen und *receptor protein phosphatase  $\mu$*  Domäne; SEA – *a single sea urchin sperm* Protein; SR – *scavenger receptor cystein-rich* Domäne; TMD – transmembrane Domäne; Die Buchstaben H, D und S in den Serinprotease Domänen (SPD) stehen für die aktiven Reste (Serin, Histidin, Aspartat) der katalytischen Triade, wobei A eine inaktive Domäne kennzeichnet und durch einen Alaninaustausch verursacht wird. Für die aufgeführten Proteasen wurden folgende Abkürzungen verwendet: DESC1 – *differentially expressed squamous cell carcinoma* Gen 1; HAT – *human airway trypsin-like* Protease; MSPL – *mosaic serine protease long-form*; Polyserase-1 – *polyserine* Protease-1.<sup>26</sup>

Außerdem werden durch die C-terminale katalytische SPD Substrate aktiviert oder abgebaut. Dies schließt membranständige Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), Wachstumsfaktoren, Cytokine und Bestandteile der Extrazellulären Matrix (ECM) ein.<sup>26</sup>

Die in der variablen Region vorliegenden CUB-Domänen treten in mehr als 2.000 löslichen oder membranassoziierten Proteinen vor und sind an einer Vielzahl vitaler Funktionen wie beispielsweise Komplementaktivierung, Entwicklungsprozesse, Gewebereparatur, Angiogenese, Zell-Signalgebung, Homöostase, Entzündungsprozesse, neuronaler Signalweiterleitung, Rezeptor-vermittelter Endozytose und Tumorsuppression beteiligt.<sup>37-39</sup> Die Funktion der am häufigsten unter den TTSPs auftretenden LDLA-Domäne ist bislang unbekannt. Erstmals beschrieben durch die Charakterisierung

---

des LDL-Rezeptors, sind diese Domänen an der Komplexierung und Beseitigung von Apolipoprotein A und B beteiligt.<sup>40</sup> In anderen Rezeptoren vermittelt sie strukturelle und funktionelle Integrität durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.<sup>41,42</sup> SEA-Domänen sind definiert als 80-110 Aminosäure-Motive, die in der ECM sowie membranassoziierten Proteinen diverser Funktion auftreten.<sup>43</sup> Diese liegen stark O-glykosyliert vor, weisen eine Proteaseschnittstelle auf und reassoziieren nach proteolytischer Spaltung des Proteins an die Zellmembran, insbesondere an Glykoproteine oder Proteoglykane.<sup>44</sup> Die FRZ-Domäne weist eine kompakte Faltung auf, liegt im Vergleich zu allen anderen 17 TTSPs jedoch nur in der Domänenstruktur von Corin vor und stellt eine Bindungsstelle für Wnt-Glykoproteine da.<sup>45,46</sup> SR-Domänen binden demgegenüber Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren, wodurch sie als immunologischer Sensor für Prokaryoten fungieren.<sup>47</sup> Im Vergleich der TTSPs liegt die MAM-Domäne nur bei den Enteropeptidasen vor und weist Sequenzhomologien zur SEA-Domäne sowie zur Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle auf.<sup>48</sup> Außerdem findet sich diese Domäne in Meprinen, Neuropilinen sowie Zelladhäsinen und spielt eine Rolle in verschiedenen Oligomerisierungsprozessen.<sup>49,50</sup>

Ausgehend von der Vielzahl an Funktionen der TTSPs kann eine Dysregulation ihrer Expression unterschiedlichste Auswirkung auf Zellwachstum, -differenzierung, intra- sowie extrazelluläre Signalkaskaden haben und Tumorgenese begünstigen.<sup>26</sup> So wird für das Einwandern in das lokale umgebende Gewebe und die Ausbreitung in andere Bereiche die Aktivität der Proteasen für den Abbau sowie Umbau der interzellulären Verbindungen sowie der extrazellulären Matrix ausgenutzt. Viele der 17 TTSPs sind während Tumorwachstum und -progression dysreguliert. Zu diesen zählen TMPRSS2-4, Corin, Hepsin, Enteropeptidase, DESC1, Matriptase-1 sowie Matriptase-2.<sup>26,36,51</sup> Da in dieser Arbeit die Isolierung und Charakterisierung neuartiger und hochaffiner Matriptase-1 Inhibitoren dargestellt wird, führt der nächste Unterpunkt die Eigenschaften der Protease und Auswirkungen einer Dysregulation auf Tumorwachstum und Progression aus.

### **1.1.1 Matriptase-1 – Biomarker & regulatorische Schnittstelle**

Den TTSPs zugeordnet ist Matriptase-1 auch unter der Bezeichnung MT-SP1<sup>52</sup>, ST14/SNC19<sup>53</sup>, TADG-15<sup>54</sup> oder Epithin<sup>55</sup> bekannt.<sup>51,56</sup> Das 80-90 kDa große Glykoprotein weist eine komplexe Struktur auf, ist in verschiedenste regulatorische Mechanismen sowie Funktionen eingebunden und wurde erstmals aus humaner Milch



isoliert.<sup>27,57,58</sup> Matriptase-1 ist am Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) und der Gewebeumbildung beteiligt.<sup>59,60</sup> Infolge der diversen Funktionen und Einfluss der Protease auf Signalkaskaden erfolgten Studien in Bezug auf die Substratspezifität und somit möglicher Interaktionspartner.<sup>61</sup> Die bevorzugten Spaltstellen (P4-(Arg/Lys)P3-(X)P2-(Ser)P1-(Arg)P1'-(Ala)) und ((P4-(X)P3-(Arg/Lys)P2-(Ser)P1(Arg)P1'(Ala)) konnten identifiziert werden, wobei X eine nicht-basische Aminosäure darstellt.<sup>27,61</sup> Von den bevorzugten Spaltstellen der Protease ausgehend konnten drei membranassoziierte Proteine als Substrat identifiziert und Prozessierung *in vitro* nachgewiesen werden.<sup>27</sup> Zu diesen Proteinen zählen der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR-2), das Zymogen des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (pro-uPA) und die inaktive Form des *hepatocyte growth factor* (pro-HGF).<sup>61-64</sup> Eine schematische Darstellung der bisher postulierten drei Hauptfunktionen humaner Matriptase-1 ist in Abb. 1.2 illustriert. Aufgrund der proteolytischen Aktivierung der zuvor aufgeführten Substrate können wahrscheinlich verschiedenste Signalkaskaden, Abbau der ECM und Wachstumsprozesse beeinflusst sowie invasives Zellwachstum und Metastasierung ausgelöst werden.

Eine verstärkte Expression der Protease ist in verschiedenen Epithel-Tumoren

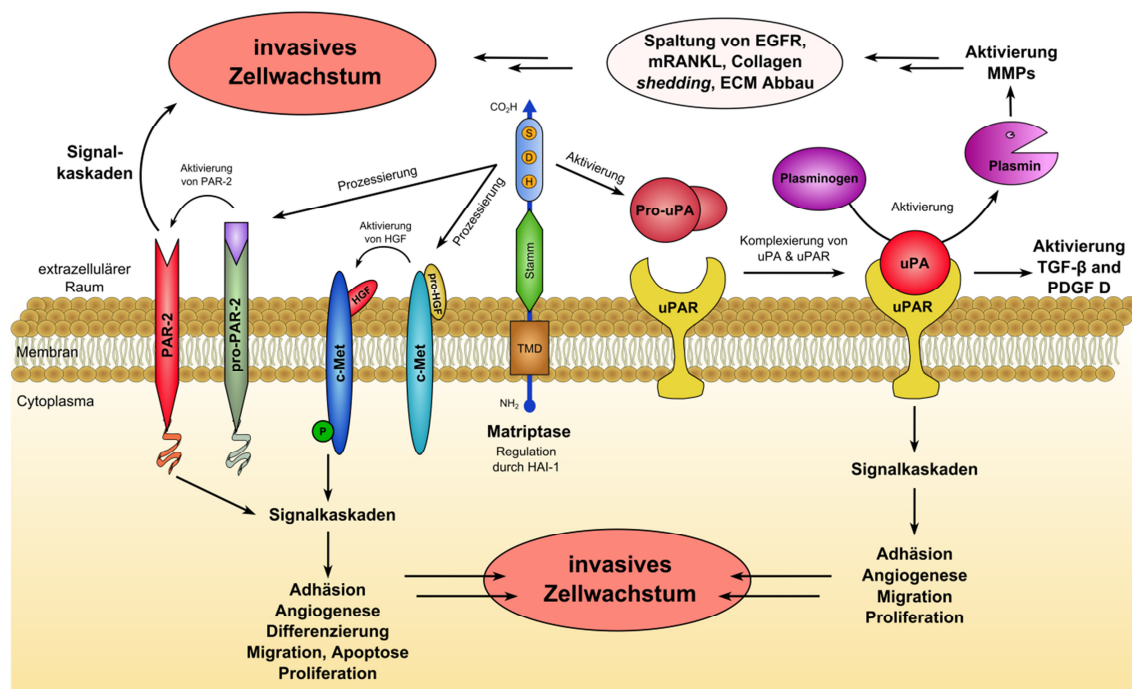


Abb. 1.2: Postulierte Hauptfunktionen von Matriptase-1 im Fall von invasivem Zellwachstum. Schematische Darstellung der beeinflussten Signalwege, durch die Zellwachstum und ECM Degradierung beeinflusst und ausgelöst werden.<sup>27</sup>

---

beschrieben und schließt Brust-, Darm-, Nieren-, Leber-, Lunge-, Mesotheliom-, Eierstock- und Prostatakrebs ein.<sup>26-28,54,65-67</sup> Matriptase-1 ist somit ein potentieller diagnostischer Biomarker und fördert im Fall einer Dysregulation Tumorentwicklung sowie invasives Zellwachstum.<sup>27,68</sup> Sie beeinflusst verschiedenste zelluläre sowie extrazelluläre Prozesse und ist somit Auslöser der durch Hanahan und Weinberg beschriebenen grundlegenden zellulären Eigenschaften von Krebs.<sup>69,70</sup> Zu den postulierten Funktionen zählen Metastasierung, Missachtung von Wachstums-suppressoren, unabhängige Proliferations-Signalwege, Übergehen von Apoptosesignalen, unabhängige Angiogenese sowie ein unbegrenztes replikatives Potential. Dies könnte zusätzlich durch eine Dysregulation der zellulären Energetik sowie Vermeidung einer Immunantwort ausgelöst werden. Zudem ist durch Instabilität sowie Mutation des Genoms gekoppelt an tumorfördernde Entzündungsprozesse eine Begünstigung denkbar.<sup>70</sup>

In früheren Studien konnte die Degradierung von Fibronectin sowie Laminin, beides Komponenten der ECM, durch rekombinant erzeugte Protease nachgewiesen werden.<sup>71</sup> Folglich hat Matriptase-1 Einfluss auf Migration und Zellkontakt. Außerdem konnte durch eine Aktivierung von PAR-2, der eine zentrale Rolle während der Zellanlagerung und frühen Entzündungsprozesse spielt, der Einfluss auf Differenzierung und Zellwachstum belegt werden.<sup>61</sup> Diese Beobachtungen konnten durch Transfektion kolorektaler Krebszellen mit einem für Matriptase-1 codierenden Plasmid bestätigt werden. So wurde eine Abnahme des Haftvermögens an der extrazellulären Matrix und Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts (F-Aktin) beobachtet.<sup>72,73</sup> In einer weiteren Studie wurde *insulin-like growth factor binding protein-related protein-1* (IGFBP-rP1/Angiomodulin/Mac25), das tumorsuppressive Eigenschaften aufweist, als Substrat der Protease beschrieben.<sup>74</sup> Durch Spaltung des Wachstumsfaktors werden wahrscheinlich die zuvor beschriebenen Eigenschaften von Krebszellen hervorgerufen, wobei die genauen Mechanismen ungeklärt sind.<sup>27,74</sup> Des Weiteren scheint Matriptase-1 essentiell für das postnatale Überleben von Mäusen zu sein. Durch *knock-out*-Modelle der Protease in Mäusen konnte ein Verlust der epithelialen Barrierefunktion der Haut, eine Veränderung des Wachstums von Haarfollikeln sowie ein Einfluss auf Thymushomöostase belegt werden.<sup>57</sup> Außerdem scheint Profilaggrin, das eine Schlüsselrolle in der Keratinaggregation und der terminalen Epitheldifferenzierung spielt, durch Matriptase aktiviert zu werden.<sup>75</sup> Somit könnte eine Dysregulation von



---

Matriptase-1 ebenfalls die Epitheldifferenzierung beeinflussen und invasives Zellwachstum auslösen.

Die Regulation humaner Matriptase-1 erfolgt zum einen durch Expression der Protease als Zymogen und zum anderen durch ihren natürlichen Inhibitor HAI-1 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor-1*).<sup>27,58,76,77</sup> Paradoxerweise spielt HAI-1 ebenfalls für die Aktivierung der Protease eine essentielle Rolle.<sup>76</sup> Der natürliche Inhibitor scheint außerdem die Expression und die intrazelluläre Verteilung der Protease zu regulieren.<sup>78</sup> So konnte eine Verschiebung des Protease-Inhibitor-Verhältnisses in späten Tumorstadien in Richtung Matriptase-1 nachgewiesen werden. Dieses Ungleichgewicht scheint die Proteaseaktivität zu verstärken und folglich den fortgeschrittenen Krankheitsverlauf durch verstärktes invasives Zellwachstum zu beeinflussen.<sup>79</sup> In einer weiteren Studie konnte außerdem eine autokatalytische Aktivierung der Protease durch Absenken des pH-Wertes, was im Zusammenhang mit zellulärer Azidose steht, gezeigt werden.<sup>80</sup> Die Aktivierung der Protease ist unabhängig von anderen Proteasen und bis heute nicht vollständig verstanden.<sup>76,77,81,82</sup>

Wie zuvor beschrieben, ist Matriptase-1 eine Serinprotease, die durch HAI-1, ihren natürlichen Inhibitor der Kunitz Familie, reguliert wird. In der vorliegenden Arbeit sollen außerdem neuartige Inhibitoren der Protease basierend auf bereits bekannten Serinproteaseinhibitoren erzeugt werden. Daher werden diese im folgenden Abschnitt für ein besseres Verständnis näher beschrieben.

## **1.2 Serinproteaseinhibitoren (SPIs) – Schalter proteolytischer Aktivität**

Inhibitoren proteolytischer Enzyme können bezogen auf Struktur, Mechanismus oder adressierte Protease untergliedert werden.<sup>23</sup> Ihrem Mechanismus entsprechend werden SPIs in Serpine, kanonische und nicht-kanonische Inhibitoren unterteilt.<sup>23,83,84</sup> Durch kovalente Bindung und Ausbildung eines irreversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes im Fall der Serpine werden extreme konformationelle Änderungen verursacht und die Protease inaktiviert.<sup>85-87</sup> Im Gegensatz dazu wird die Interaktion zwischen nicht-kanonischen Inhibitoren wie z. B. Hirudin und der entsprechenden Protease durch zwei N-terminale Interaktionsregionen erzeugt.<sup>88,89</sup> Hierbei interagiert der Inhibitor in einer zwei-Stufen Kinetik zum einen als Substratpendant mit dem aktiven Zentrum und zum anderen durch Bindung eines weiteren Bereichs mit dem Enzym.<sup>90</sup> Abweichend davon interagieren kanonische SPIs mit einer Größe von 3-21 kDa durch eine konvexe in das

aktive Zentrum ragende Inhibitorschleife mit der Protease und verursachen keine strukturellen Veränderungen.<sup>91</sup> Hierbei ist der P<sub>1</sub>-Rest des Inhibitors essentiell für die Komplexbildung und steuert einen wesentlichen Bestandteil der Assoziationsenergie bei.<sup>92</sup> Eine schematische Darstellung der Inhibition einer Protease und die durch Schechter und Berger erstellte Nomenklatur in Bezug auf für die Interaktion essentielle Aminosäurereste und Bindungstaschen ist in Abb. 1.3 A gezeigt.<sup>93</sup> Als Beispiel für eine solche Interaktion ist in Abb. 1.3 B die Co-Kristallstruktur der katalytischen Serinprotease-Domäne der humanen Matriptase-1 im Komplex mit der Kunitz Domäne I ihres natürlichen Inhibitors HAI-1 zu sehen.<sup>94</sup>

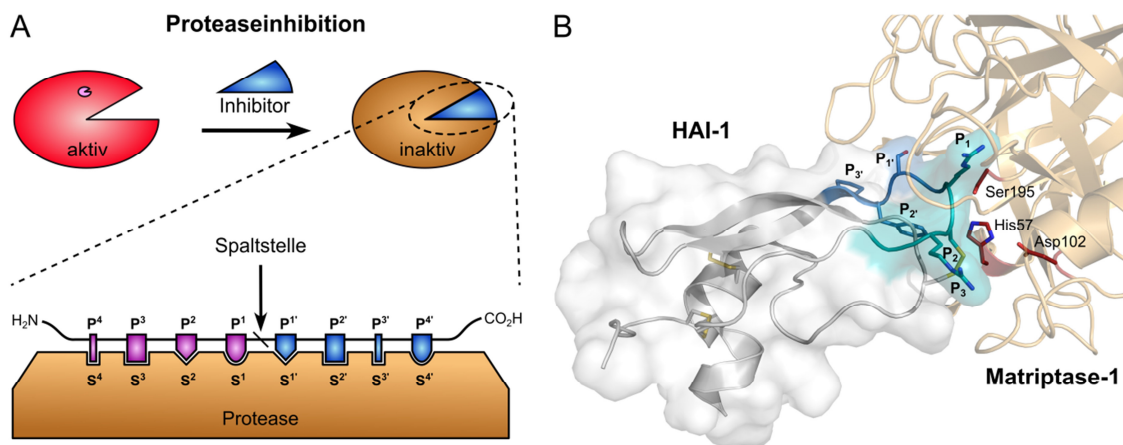


Abb. 1.3: Regulation von Proteasen durch makromolekulare Inhibitoren. **A:** Schematische Darstellung der Einlagerung eines Proteaseinhibitors in die Substrat-Bindungstasche des Enzyms. Die Bindungsstellen sowie die für die Interaktion verantwortlichen Aminosäurereste sind nach der durch Schechter und Berger erstellten Nomenklatur bezeichnet.<sup>93</sup> Substrate der Protease werden an der gekennzeichneten Spaltstelle hydrolysiert. **B:** Darstellung eines Protease-Inhibitor-Komplexes bestehend aus HAI-1 (Kunitz Domäne I) und der Serinprotease-Domäne der humanen Matriptase-1 (PDB: 4isn).<sup>94</sup> HAI-1 ist als Cartoon (grau) mit Oberfläche (weiß) dargestellt. Die Reste P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> sind in cyan mit Seitenketten gezeigt, wohingegen die Reste P<sub>1'</sub>-P<sub>3'</sub> in blau mit Seitenketten vorliegen. Matriptase-1 ist als transparenter Cartoon in orange illustriert, wobei die katalytische Triade (H57, D102, S195) in Rot mit Seitenketten als Stäbe hervorgehoben ist. Disulfidbrücken sind als gelbe Stäbe dargestellt. Die Bindungstaschen sowie die Oberfläche der Protease sind für eine bessere Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Strukturell betrachtet gliedern sich die makromolekularen SPIs in  $\alpha$ -helikale Proteine,  $\beta$ -Faltblatt Proteine,  $\alpha/\beta$  Proteine und kleine disulfidreiche Proteine mit unterschiedlichen Faltungsmotiven. Während die Superfamilie der Serpine ein hochkonserviertes  $\alpha_1$ -anti-Trypsin Motiv teilen, weisen nicht-kanonische SPIs kein konserviertes Bindungsmotiv auf.<sup>95,96</sup> Dennoch liegt bei allen Inhibitoren dieser Klasse eine unstrukturierte N-terminale Region vor, die durch Komplexbildung ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt mit der Protease ausbildet.<sup>83</sup> Einige der kanonischen SPI-Familien (BPTI, Kazal, *Potato*, *Cereal*, SSI, STI und Ecotin) weisen hingegen typische Sekundärstrukturelemente sowie eine

---

hydrophobe Kernstruktur auf. Im Gegensatz dazu fehlt dies bei anderen kanonischen SPI-Familien (*Squash*, Bowman-Birk, *Grasshopper*, *Ascaris*). Hier wird jedoch eine definierte Tertiärstruktur durch Ausbildung von stabilisierenden intramolekularen Disulfidbrücken gewährleistet.<sup>23,84</sup>

In den vorherigen Abschnitten wurde bereits beschrieben, dass Matriptase-1 eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Entwicklung von Krebs spielt. Als Auslöser hierfür wird eine übermäßige Dysregulation der Stabilisierung, der Expression sowie der Regulation von Matriptase-1 in verschiedenen Tumorgeweben beschrieben. Somit könnte durch eine spezifische Inhibition der Protease das Tumorwachstum und die Metastasierung verringert oder gar verhindert werden.<sup>26,27</sup> Diese Vermutung konnte anhand von Experimenten mit in Mäusen implantierten Krebszellen (PC-3) belegt werden. Durch Behandlung der Versuchstiere mit dem Matriptase-1 Inhibitor Ecotin ( $K_i = 0,78 \text{ nM}$ ) konnte eine verringerte Tumorgröße sowie Metastasierung nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition humaner Matriptase-1 durch Ecotin Tumorwachstum und Metastasierung beeinflusst.<sup>81</sup> Die gleichen Effekte der Proteaseinhibition auf Tumorwachstum und Progression konnten in Versuchen mit niedermolekularen Matriptase-1 Inhibitoren beobachtet werden. Hierfür wurden zwei weitere Prostatakrebszelllinien (CWR22R, CWRSA6) Mäusen implantiert und die Versuchstiere anschließend mit dem Inhibitor CVS-3983 ( $K_i = 3,3 \text{ nM}$ ) behandelt. Hier konnte eine Reduktion des Tumolvolumens um bis zu 65 % im Vergleich zu Referenztieren erzielt und eine geringere Invasivität der Tumorzellen nachgewiesen werden.<sup>97</sup> Diese Beobachtungen konnten in weiteren PC-3 Xenograft-Modellen mit anderen niedermolekularen Inhibitoren der Gruppe um Steinmetzer bestätigt werden.<sup>98</sup>

### **1.3 Protein Engineering**

Um neuartige sowie hochaffine Inhibitoren der humanen Matriptase-1 zu erzeugen, müssen neue Eigenschaften in vorhandene Molekülstrukturen eingebracht werden. Durch das Verfahren des *protein engineering* können gezielt neue Funktionen installiert oder bereits vorhandene Eigenschaften verbessert bzw. verändert werden.<sup>99,100</sup> Dies kann durch rationales und/oder evolutives Proteindesign erfolgen.<sup>101</sup> Durch Kombination verschiedener biochemischer sowie molekularbiologischer Methoden können somit Eigenschaften auf unterschiedlichen Wegen oder in Kombination der zuvor erwähnten Methoden eingeführt werden.<sup>102</sup> Da das *protein engineering* eine

---

Schlüsselfunktion für die angefertigte Arbeit darstellt, werden beide Methoden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

### 1.3.1 Rationales Proteindesign

Grundvoraussetzung für das rationale Design eines ausgewählten Proteins sind detaillierte Kenntnisse der Funktion sowie der Struktur des Moleküls.<sup>103,104</sup> Eine strukturelle Aufklärung eines Proteins kann durch Röntgen-Strukturanalyse<sup>105</sup> sowie mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)<sup>106</sup> erfolgen. Anhand einer computergestützten Analyse der Struktur können gezielt für eine Eigenschaft relevante Aminosäurereste spezifisch modifiziert werden. Dadurch können bestehende Eigenschaften beeinflusst oder neue Funktionen eingeführt werden.<sup>107</sup>

Nachteilig ist jedoch der nicht absehbare Einfluss von Modifikationen der Aminosäuresequenz auf die Faltungseigenschaften des Proteins.<sup>108,109</sup> So kann ein Aminosäureaustausch zum völligen Aktivitätsverlust von Enzymen aufgrund einer fehlerhaften oder nicht vorhandenen Tertiärstruktur führen. Außerdem ist die Methode des rationalen Designs auf die Erzeugung und Charakterisierung einzelner Varianten oder überschaubarer Molekülbibliotheken beschränkt.<sup>110</sup>

Durch das Verfahren des rationalen Proteindesigns konnte die thermische Stabilität der Ribonuklease H1 des Bakteriums *Shewanella oneidensis* und anderer Proteine erhöht werden.<sup>111,112</sup> Des Weiteren konnten Disulfidbrücken in den *fibroblast growth factor 21* (FGF21) implementiert und eine O-Glykosylierungs- sowie eine Proteasespaltstelle deletiert werden, wodurch die Stabilität und die Expression in *P. pastoris* verbessert werden konnten.<sup>113</sup> Durch eine gezielte Punktmutation (I86A) konnte außerdem die Enantioselektivität der sekundären-Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* umgekehrt werden.<sup>114</sup> Ferner konnte die Spezifität der Glukose-Dehydrogenase aus *Haloferax mediterranei* durch Mutation G206D von NADP<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> verändert werden.<sup>115</sup> In einer weiteren Studie wurde die Disulfidbrücke des *sunflower trypsin inhibitor-1* (SFTI-1) der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) durch 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole ersetzt und dadurch die Redoxstabilität gesteigert.<sup>116,117</sup> Ebenfalls konnte durch das Einführen eines 1,4- bzw. 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazols in das Peptidrückgrat des Inhibitors SFTI-1 eine definierte cis- bzw. trans-Konformation erreicht werden, wodurch das Implementieren spezifischer Konformationen in das Peptidrückgrat von Proteinen möglich wird.<sup>118</sup> Außerdem konnten hochaffine

Inhibitoren der humanen Matriptase-1 durch strukturbasiertes Design der Inhibitoren SFTI-1 sowie *Momordica cochinchinensis* Trypsininhibitor II (MCoTI-II) mit nano- bis picomolaren Inhibitionskonstanten erzeugt werden.<sup>119,120</sup>

### 1.3.2 Evolutes Proteindesign (Directed Evolution)

Durch das Verfahren der gerichteten Evolution werden im Gegensatz zum rationalen Proteindesign keine spezifischen Modifikationen von Aminosäureresten eingeführt. Durch die Kombination verschiedener molekularbiologischer und biochemischer Methoden können evolutive Selektionsprozesse imitiert und Moleküle mit gewünschten Eigenschaften isoliert werden. Dieses Verfahren geht auf Arbeiten an eigenständig reproduzierbaren DNA-Fragmenten der Bakteriophagen MS-2 und Q $\beta$  zurück. Durch einen Selektionsdruck während Wachstums- und Replikationsphase konnten schneller wachsende Varianten mit einer um 83 % verkürzten Replikase im Vergleich zu der im ursprünglichen Genom vorliegenden identifiziert werden.<sup>122</sup> In Abb. 1.4 ist ein generelles Schema des evolutiven Proteindesigns dargestellt und illustriert die verschiedenen Phasen des Verfahrens. Grundlage dieses Verfahrens ist das Implementieren zufälliger Mutationen auf DNA-Ebene durch *error prone* PCR<sup>123,124</sup>,

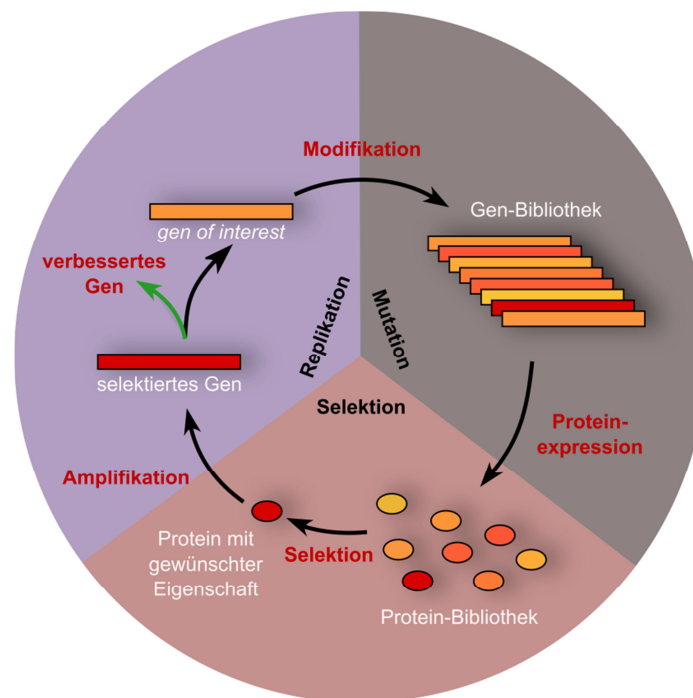


Abb. 1.4: Generelles Schema des evolutiven Proteindesigns. Ausgehend von einem nativen Gen eines Proteins werden zufällige Mutationen eingeführt. Nach Expression der erzeugten Variantenbibliothek auf Proteinebene wird diese auf eine gewünschte Eigenschaft durchmustert. Für die Anreicherung von Varianten mit gewünschter Funktion kann der Selektionszyklus bzw. das gesamte Verfahren mehrfach wiederholt werden. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von Wang *et al.* erstellt.<sup>121</sup>

---

randomisierte Oligonukleotide,<sup>125-127</sup> DNA-shuffling,<sup>128</sup> somatische Hypermutation<sup>129</sup> oder fehlerhafte Polymerasen<sup>130,131</sup>. Das Verfahren des evolutiven Proteindesigns ist im Gegensatz zum rationalen Proteindesign nicht von strukturellen Informationen und Funktionen des Proteins abhängig. Grundvoraussetzung für die Selektion von Proteinvarianten mit gewünschter Eigenschaft ist eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung während des Verfahrens. Nur durch direkte oder indirekte Verbindung der genetischen Information mit dem exprimierten Protein können Varianten mit distinkter Funktion identifiziert und charakterisiert werden. So können verschiedenste Selektionsmethoden für das Verfahren des evolutiven Proteindesigns angewendet werden. Hierzu zählen beispielsweise *phage display*,<sup>132,133</sup> *bacterial display*,<sup>134,135</sup> *ribosomal display*,<sup>136,137</sup> *mRNA display*<sup>138,139</sup> sowie *yeast surface display*.<sup>140,141</sup> Ein limitierender Faktor der *in vivo* Systeme stellt das Erzeugen von Bibliotheken mit möglichst hohen Variantenzahlen sowie deren Durchmusterung dar. Im Gegensatz dazu können *in vitro* Bibliotheken mit 10<sup>12</sup>-10<sup>13</sup> unterschiedlichen Molekülen generiert und durchmustert werden.<sup>138</sup>

Bis heute stellt das Verfahren der gerichteten Evolution eine der effizientesten Methoden zur Generierung von Proteinen und Molekülen mit distinkten Eigenschaften und Funktionen dar.<sup>142,143</sup> So konnten mit Hilfe des Verfahrens enantioselektive Mutanten der *Pseudomonas aeruginosa* Esterase (EstA) generiert werden.<sup>144</sup> Ebenfalls konnten DNA-Aptamere mit Bindungskonstanten von 0,65 pM für *vascular endothelial cell growth factor-165* (VEGF-165) und 38 pM für interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) isoliert werden.<sup>145</sup> Hierbei wurde für die Randomisierung der DNA-Fragmente ein nicht-natürliches basisches Nukleotid eingeführt, wodurch die chemische und strukturelle Diversität erhöht wurde. Des Weiteren konnten selektiv bindende Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) für eine charakteristische basische Spaltstelle des Hemagglutinin Proteins (HA) des H5N1 Virus selektiert werden.<sup>146</sup> In weiteren Studien konnte außerdem die Lösungsmitteltoleranz<sup>147</sup> und thermische Stabilität<sup>148</sup> von Enzymen erhöht und die Substratspezifität einer Endonuklease I-SecI verändert werden.<sup>149</sup> Ebenfalls konnten Integrin-Rezeptor-bindende Cystinknoten isoliert und deren Funktionalität *via* PET bestätigt werden.<sup>141</sup> Für die Durchmusterung dieser Bibliotheken wurde die Methode des *yeast surface display* verwendet. Da für die Selektion Matriptase-1 bindender Cystinknoten das gleiche System verwendet werden soll, wird dies im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

### 1.3.3 Yeast Surface Display

Wie schon zuvor erwähnt, ist einer der zentralen Aspekte von Selektionsverfahren eine Kopplung des Phäno- und Genotyps der erzeugten Proteinvarianten. Im Fall des *yeast surface display* wird das mutierte Protein als Fusionsprotein mit einem Zellwandprotein exprimiert.<sup>150</sup> Für die Oberflächenpräsentation wurden bereits verschiedene Hefestämme und Oberflächenrezeptormoleküle verwendet.<sup>151</sup> Am häufigsten kommt das *Saccharomyces cerevisiae* Aga2p-System zum Einsatz.<sup>140,152</sup> Die Proteinvarianten werden hierbei als Fusion mit der Aga2p-Untereinheit des *mating*-Proteins  $\alpha$ -Agglutinin der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert. Durch zwei Disulfidbrücken wird das Fusionsprotein nach Expression an die Aga1p-Untereinheit, die durch einen Glycophosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellwand verankert ist, an die Hefeoberfläche gekoppelt (Abb. 1.5.). Das Gen des zu präsentierenden Proteins wurde zuvor in ein *single-copy shuttle* Vektor als Fusion mit der Aga2p-Untereinheit kloniert. Die Aga1p-Untereinheit liegt im Gegensatz dazu integriert im Hefechromosom vor. Die Expression beider Proteine steht unter der Kontrolle eines GAL1-Promotors. Für den Nachweis der Oberflächenpräsentation liegen N-terminal und C-terminal des mutierten Proteins ein Hämagglutinin(HA)-Epitop bzw. ein cMyc-Epitop vor. Das zu präsentierende Protein kann C- bzw. N-terminal an Aga2p fusioniert vorliegen, wodurch die Bindungsaffinität des Proteins beeinflusst werden kann.<sup>153</sup> Die Oberflächenpräsentation als C-terminale Aga2p-Fusion ist jedoch die Regel. Nach Induktion der Proteinexpression liegen ca. 50.000 Kopien des mutierten Proteins auf der Hefeoberfläche vor.<sup>150</sup> Durch optimierte

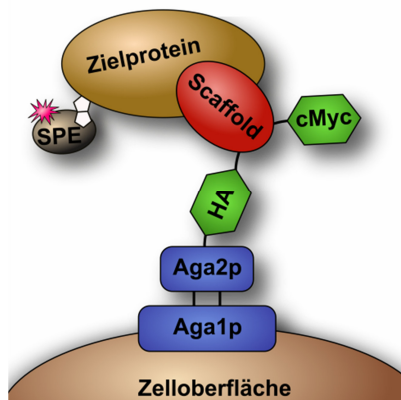


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des von Boder und Wittrup entwickelten *yeast surface display*.<sup>140</sup> Das in Rot dargestellte *scaffold*-Molekül stellt das mutierte Protein dar. In Grün sind die flankierenden Epitope (HA, cMyc) illustriert. Das N-terminale Aga2p sowie das in der Zellwand verankerte Aga1p sind in Blau dargestellt. Der Nachweis des biotinylierten Zielproteins (hellbraun) auf der Hefeoberfläche kann durch einen Streptavidin gekoppelten Fluorophor (SPE) erfolgen.



---

Transformationsprotokolle können mittels homologer Rekombination Bibliotheken mit bis zu  $10^9$  Proteinvarianten pro Tag erzeugt werden.<sup>154</sup> Die Durchmusterung der Bibliotheken kann nach Induktion der Präsentation durch magnetische Sortierung (MACS) oder *via* Durchflusszytometrie (FACS) erfolgen.<sup>155</sup> Des Weiteren können mit Hilfe des eukaryotischen Faltungsapparates auch Proteine mit komplexer Tertiärstruktur als *scaffold*-Molekül eingesetzt werden.<sup>150</sup> Zusätzlich wird die Faltung instabiler Proteinvarianten unterstützt und fehlgefaltete Mutanten durch die in der Hefe vorliegende *unfolded protein response* (UPR) degradiert.<sup>156</sup> Als *scaffold*-Moleküle für *yeast surface display* wurden bereits *single chain variable fragments* (scFV),<sup>157</sup> Knottine,<sup>141</sup> Sso7d,<sup>158</sup> *green fluorescent protein* (GFP),<sup>159</sup> die *kringle*-Domäne<sup>160</sup> und die zehnte Domäne von Fibronectin<sup>161</sup> verwendet. Es konnten Bindemoleküle für Lysozym, Fluorescein, *epidermal growth factor* (EGF), verschiedenste Rezeptoren sowie andere Zielproteine isoliert werden.

Da in der vorliegenden Arbeit hochaffine Inhibitoren der Matriptase-1 basierend auf Inhibitor-Cystinknoten isoliert werden sollen, werden diese im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

#### **1.3.4 Cystinknoten – einzigartige *scaffold*-Strukturen**

Die Familie der Cystinknoten untergliedert sich in Inhibitor-Cystinknoten (ICKs), zyklische Cystinknoten (CCKs) und Wachstumsfaktor-Cystinknoten (GFCK). Ein Großteil der Cystinknoten sind Proteaseinhibitoren mit nano- bis picomolaren Inhibitionskonstanten und weisen ein lineares Peptidrückgrat auf.<sup>162</sup> Während CCKs sich durch eine makromolekulare Zyklisierung von ICKs und GFCKs abgrenzen,<sup>163</sup> unterscheiden sich GFCKs von ICKs und CCKs durch ihre Größe und geringere Stabilität.<sup>162</sup> Cystinknoten sind in der Natur weit verbreitet und konnten bereits aus Arthropoden, Pilzen, Mollusken, Pflanzen, Schwämmen und Vertebraten isoliert werden.<sup>164,165</sup> Neben einer Länge von 30-40 Aminosäuren zeichnen sich Cystinknoten durch eine hohe thermische, chemische und proteolytische Stabilität aus.<sup>165-170</sup> Diese Eigenschaften begründen sich auf eine durch drei Disulfidbrücken ausgebildete Pseudoknoten-Struktur (Abb. 1.6).<sup>171</sup>



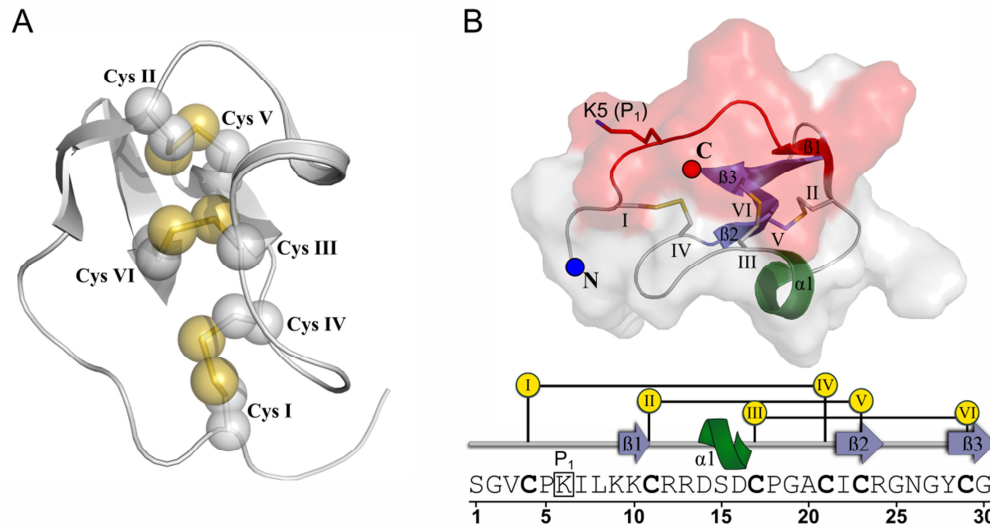


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Cystinknoten-Motivs und der Topologie eines Cystinknotens. **A:** Pseudoknotenstruktur des ICK MCoTI-II. Das Protein ist als Cartoon in hellgrau dargestellt. Die Cystein-Reste sind entsprechend ihrem Auftreten in der Aminosäuresequenz mit CysI bis CysVI nummeriert. Disulfidbrücken sind als transparente Sphären und Stäbe in Gelb illustriert. **B:** Sekundärstruktur und Topologie des Trypsininhibitors MCoTI-II. Hellblaue Pfeile zeigen  $\beta$ -Faltblätter. Die kurze Helix  $\alpha 1$  ist in grün dargestellt. Darunter ist die Aminosäuresequenz des ICK mit Disulfidbrücken (gelbe Stäbe bzw. schwarze Linien) gezeigt. Cystein-Reste sind hier mit I-VI markiert. Den Darstellungen liegt die NMR-Struktur des ICK's MCoTI-II zugrunde (PDB: 1ha9).<sup>172</sup>

Durch die Verknüpfungen CysI-CysIV und CysII-CysV entsteht eine ringförmige Struktur, die von der dritten Disulfidbrücke (CysIII-CysVI) durchspannt wird. Außerdem weisen alle Cystinknoten drei kurze antiparallele  $\beta$ -Faltblätter auf, die durch kurze Schleifen verbunden sind. Zusammen mit einem komplexen Netzwerk an Wasserstoffbrücken tragen diese Eigenschaften ebenfalls zur Stabilität der Moleküle bei.<sup>173,174</sup> Neben der Inhibition von Proteasen<sup>120,175</sup> agieren Cystinknoten außerdem als Ionen-Kanal-Blocker<sup>176</sup> und weisen antimikrobielle,<sup>177</sup> anti-HIV,<sup>178</sup> insektizide<sup>179</sup> und hämolytische Aktivität<sup>180</sup> auf. Cystinknoten sind synthetisch sowie rekombinant zugänglich. Sie können durch Festphasen-Peptidsynthese erzeugt und anschließend oxidativ gefaltet werden.<sup>162,175,181</sup> Ebenfalls ist eine Expression von MCoTI-II und anderen Cyclotiden in *E. coli* möglich.<sup>182,183</sup>

Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Schleifenlängen und Aminosäurezusammensetzung von Cystinknoten mit Ausnahme der Cystein-Reste modifiziert werden können.<sup>141,175</sup> Ebenfalls konnten Bindemoleküle für medizinisch relevante Zielproteine aus kombinatorischen Cystinknoten-Bibliotheken isoliert und

---

ihre Funktion durch PET (*positron emission tomography*) sowie SPECT (*single-photon emission computed tomography*) Studien belegt werden.<sup>184-187</sup>

Inhibitor-Cystinknoten stellen aufgrund ihrer geringen Größe, hoher Stabilität und postulierten oralen Verfügbarkeit ideale Ausgangsmoleküle für die Isolierung hoch-affiner sowie neuartiger Inhibitoren therapeutisch und diagnostisch relevanter Serinproteasen dar.<sup>141,162,170,188</sup>

## **1.4 Zielsetzung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen basierend auf den Inhibitor-Cystinknoten SOTI-III und MCoTI-II neuartige, hochaffine sowie selektive Inhibitoren der für Tumordiagnostik und -therapie relevanten TTSP Matriptase-1 erzeugt werden.

Hierfür soll zunächst die funktionale Präsentation von SOTI-III auf der Hefeoberfläche belegt und die Struktur des Cystinknotens aufgeklärt werden. Anschließend soll ein strukturbasiertes Design für Varianten der Cystinknoten erstellt und kombinatorische Bibliotheken dieser in *S. cerevisiae* erstellt werden.

Durch das Verfahren des *yeast surface display* sollen dann Matriptase-1-bindende Varianten mittels Durchflusszytometrie selektiert und auf ihre Bindungseigenschaft untersucht werden.

Im Anschluss sollen ausgewählte Varianten mittels chemischer Festphasensynthese synthetisiert, oxidativ gefaltet und biochemisch charakterisiert werden. Die affinsten und selektivsten Inhibitoren sollen dann in Dosis-Wirkungs-Studien auf Prostatakrebszellen bezüglich ihrer Aktivität als Matriptase-1 Inhibitor untersucht werden.

---

## 2 Materialien

### 2.1 Bakterien-, Hefestämme und verwendete humane Zelllinien

Bakterienstämme – *Escherichia coli*

**DH5 $\alpha$** <sup>189</sup> - [F-  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA*supE44 *thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ -] (Fa. Invitrogen)

**BL21-CodonPlus(DE3)-RP** - [F- *ompT hsdS*(rB- mB-) *dcm+* Tetr *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA Hte* [*argU proL Camr*]] (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)

Hefestämme – *Saccharomyces cerevisiae*

**EBY100** - [a *GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2\_1 his3\_200 pep4::HIS2 prb1\_1.6R can1 GAL*, Trp-Leu-] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Humane Zelllinien

**PC-3** (Merck KGaA)

### 2.2 Plasmide

#### 2.2.1 pET42dest His-Matriptase (cd) 596-855

Für die Expression der katalytischen Domäne der humanen Matriptase-1 wurde der Vektor pET43dest His-Matriptase 596-855 durch die Fa. Merck KGaA zur Verfügung gestellt. Der Vektor ist vom Expressionsvektor pET42 abgeleitet, wodurch ein Expressionsstamm mit T7-RNA Polymerase unter der Kontrolle eines Lac-Operons benötigt wird. Die kodierende Sequenz des Fusionsproteins bestehend aus Proteasedomäne und N-terminalen hexa-His-tag wurde mit Hilfe der Gateway® Technologie der Fa. Invitrogen in den Vektor durch homologe Rekombination eingebracht. Auf dem Vektor liegt ebenfalls die codierende Sequenz für eine Kanamycinresistenz vor.

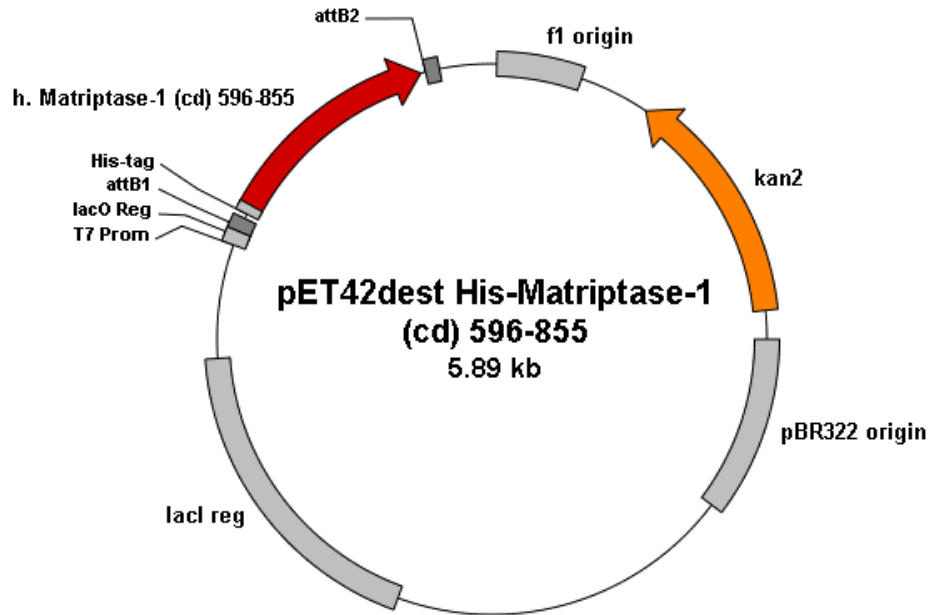


Abb. 2.1: Genetische Karte des Vektors pET42dest His-Matriptase-1 (cd) 596-855. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *f1 origin*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1, *kan2*: Kanamycinresistenz vermittelnde Sequenz, *pBR322 origin*: Replikationsursprung des pBR322-Plasmids, *lacI reg*: Kodierende Sequenz des lac Repressors in *E. coli*, *T7 Prom*: Promotor/Operator-Region des T7 Promotors, *lacO Reg*: Promotor/Operator-Region des Lactose-Operons, *attB1/2*: Rekombinationsstellen des Gateway® Klonierungssystems, *His-tag*: Kodierende Sequenz eines hexa-Histidin-tags, h. Matriptase-1 (cd) 596-855: Kodierende Sequenz der katalytischen Domäne der humanen Matriptase-1 von Aminosäure 596 bis 855.

### 2.2.2 pCT-EGFR

Der für das Aga1p/Aga2p System genutzte Vektor pCT-EGFR wurde von der Arbeitsgruppe um Jennifer Cochran zur Verfügung gestellt. Der Vektor weist einen Replikationsursprung sowohl für Hefen (ARSH4/CEN6) als auch für Bakterien auf (pUC origin). Da der Vektor als *single copy* Plasmid in Hefe vorliegt, ist eine Amplifikation durch Retransformation in *E. coli* notwendig, wofür das pUC origin benötigt wird. Den Vektor tragende Hefen können durch den auf dem Plasmid kodierten auxotrophen Marker Trp1 Tryptophan synthetisieren und so selektiert werden. Das auf der Hefeoberfläche zu präsentierende Fusionsprotein, bestehend aus Agglutinin-Untereinheit 2 (Aga2p) und dem Protein der Wahl, welches N-terminal durch das Hämagglutinin Epitop (HA-Epitop) und C-terminal von einem cMyc-Epitop flankiert wird, steht unter der Kontrolle eines Galactose Promoters (Gal1/10 Promoter). Zusätzlich ist zwischen Aga2p und dem zu präsentierenden Protein ein Glycin-Serin-Linker (GS-Linker) sowie eine Faktor Xa Spaltstelle in das Konstrukt eingebracht, sodass sterische Bindungsprobleme vermieden werden und das präsenitierte Protein von der

Hefeoberfläche proteolytisch abgespaltet werden kann. Die Detektion und Quantifizierung der Oberflächenpräsentation kann durch Nachweis des N- oder C-terminalen Epitops mittels Antikörpermarkierung erfolgen. Für die Selektion von mit dem Vektor transformierten Bakterien, wird das ebenfalls auf dem Vektor codierte  $\beta$ -Lactamase Gen (Amp) genutzt, welches eine Ampicillinresistenz vermittelt.

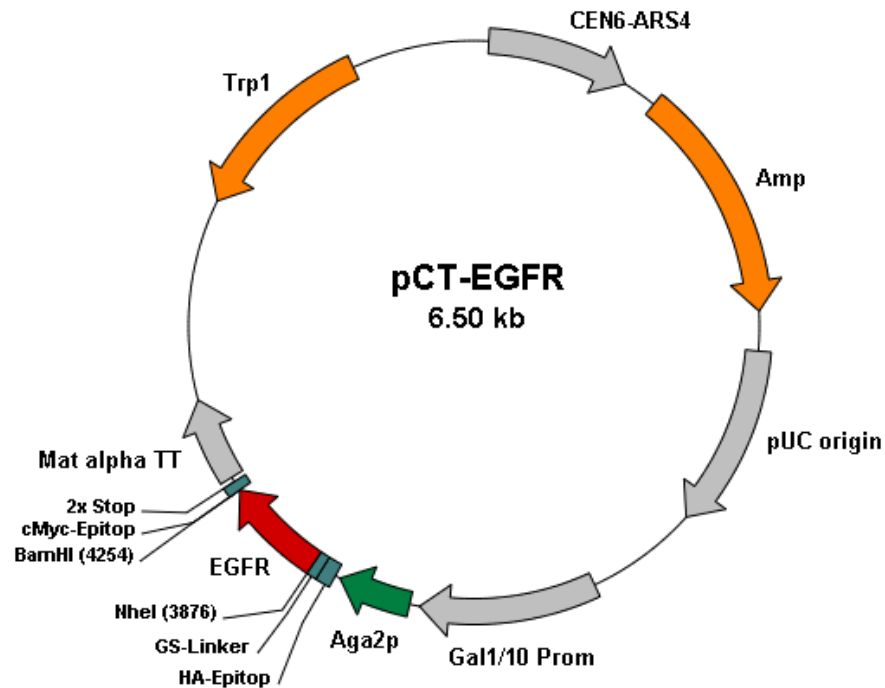


Abb. 2.2: Genetische Karte des Plasmides pCT-EGFR. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *Trp1*: Kodierendes Gen für die Phosphoribosylanthranilate Isomerase (Auxotrophiemarker), *CEN6-ARS4*: *S. cerevisiae* Replikationsursprung, *Amp*: Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Antibiotikaresistenz), *pUC origin*: *E. coli* Replikationsursprung, *Gal1/10 Prom*: Region des Galaktosepromotors, *Aga2p*: Kodierende Sequenz der zweiten  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheit, *HA-Epitop*: Kodierende Sequenz des Hämagglutinin-Epitops, *GS-Linker*: Abstandhalter bestehend aus der Wiederholung von vier Glycinen und einem Serin, *EGFR*: Kodierende Sequenz eines Fragmentes des *epidermal growth factor receptor*, *cMyc-Epitop*: Kodierende Sequenz des myc-Epitops, *NheI*, *BamHI*: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, *Mat alpha TT*: Terminierende Sequenz der Transkription.

### 2.2.3 pCT-Trx-VHH

Der Vektor pCT-Trx-VHH wurde vom Arbeitskreis zur Verfügung gestellt und basiert auf dem Plasmid pCT-EGFR. Die kodierende Sequenz des EGFR-Fragmentes wurde durch die eines Thioredoxin-bindenden VHH-Antikörpers ausgetauscht, welcher ein Platzhalter für weitere Klonierungen darstellt.

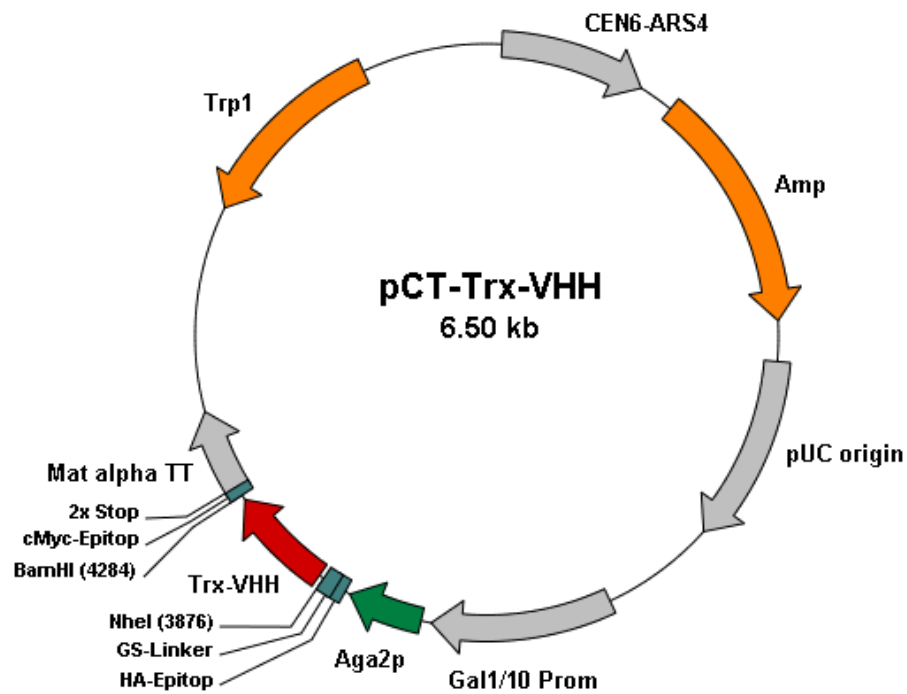


Abb. 2.3: Genetische Karte des Plasmides pCT-Trx-VHH. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *Trp1*: Kodierendes Gen für die Phosphoribosylanthranilate Isomerase (Auxotrophiemarker), *CEN6-ARS4*: *S. cerevisiae* Replikationsursprung, *Amp*: Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Antibiotikaresistenz), *pUC origin*: *E. coli* Replikationsursprung, *Gal1/10 Prom*: Region des Galaktosepromotors, *Aga2p*: Kodierende Sequenz der zweiten  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheit, *HA-Epitop*: Kodierende Sequenz des Hämagglutinin-Epitops, *GS-Linker*: Abstandhalter bestehend aus der Wiederholung von vier Glycinen und einem Serin, *Trx-VHH*: Kodierende Sequenz eines Thioredoxin bindenden VHH-Antikörpers, *cMyc-Epitop*: Kodierende Sequenz des myc-Epitops, *NheI*, *BamHI*: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, *Mat alpha TT*: Terminierende Sequenz der Transkription.

#### 2.2.4 pCT-SOTI-III-wt

Der Vektor pCT-SOTI-III-wt wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt, um zu überprüfen, ob das Knottin SOTI-III wt funktional auf der Hefeoberfläche präsentiert werden kann. Als Akzeptorplasmid wurde das Plasmid pCT-EGFR genutzt und das EGFR-Fragment gegen die kodierende Sequenz des Trypsininhibitors SOTI-III-wt ausgetauscht. Alle anderen Eigenschaften sind identisch zu dem unter 2.2.2 beschriebenen Plasmid.

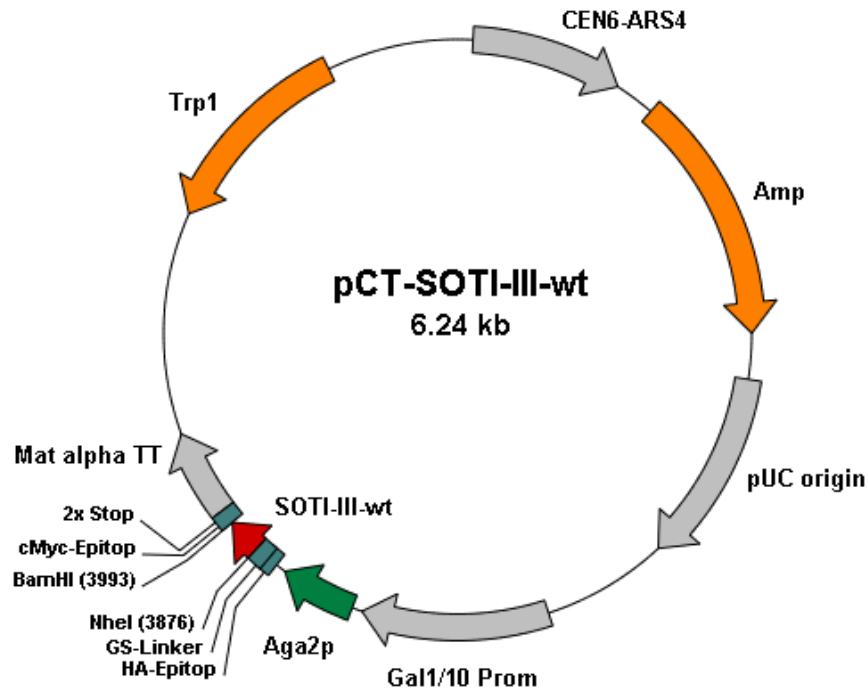


Abb. 2.4: Genetische Karte des Plasmides pCT-SOTI-III-wt. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *Trp1*: Kodierendes Gen für die Phosphoribosylanthranilate Isomerase (Auxotrophiemarker), *CEN6-ARS4*: *S. cerevisiae* Replikationsursprung, *Amp*: Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Antibiotikaresistenz), *pUC origin*: *E. coli* Replikationsursprung, *Gal1/10 Prom*: Region des Galaktosepromotors, *Aga2p*: Kodierende Sequenz der zweiten  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheit, *HA-Epitop*: Kodierende Sequenz des Hämagglutinin-Epitops, *GS-Linker*: Abstandhalter bestehend aus der Wiederholung von vier Glycinen und einem Serin, *SOTI-III-wt*: Kodierende Sequenz des Trypsininhibitors SOTI-III wt, *cMyc-Epitop*: Kodierende Sequenz des myc-Epitops, *NheI*, *BamHI*: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, *Mat alpha TT*: Terminierende Sequenz der Transkription.

---

## **2.3 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker**

Die DNS-Längenstandards wurden mit Aqua bidest und Auftragspuffer auf eine Konzentration von 0,1 µg/µL eingestellt und bei - 20 °C gelagert.

### **λ-DNS/Eco47I (AvaII) Marker, 13 (Fermentas)**

Der λ-DNS/*Eco47I* (*AvaII*) Marker, 13 zeigt 36 definierte Fragmente. Hierfür wurde die λ-Phagen DNS vollständig mit der Endonuklease *Eco47I* verdaut und anschließend gereinigt. Die einzelnen Fragmente haben folgende Längen in Basenpaaren: 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1611, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 29, 23.

### **O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)**

Der Marker enthält ein Gemisch aus 10 individuellen DNA-Fragmenten, die über Chromatografie gereinigt wurden und nachfolgende Fragmentlängen in Basenpaaren ergeben: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

### **O'GeneRuler™DNA Ladder, Ultra Low Range, ready-to-use (Fermentas)**

Der Marker enthält ein Gemisch aus 11 individuellen DNA-Fragmenten, die über Chromatografie gereinigt wurden und nachfolgende Fragmentlängen in Basenpaaren ergeben: 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10.

### **Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)**

Dieser Marker dient der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen, die mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt wurden, und setzt sich aus sieben verschiedenen gereinigten Proteinen zusammen. Zur Visualisierung der einzelnen Markerbanden erfolgt im Anschluss eine Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau. Die einzelnen Proteine haben folgende Molekulargewichte in Da: 116.000, 66.200, 45.000, 35.000, 25.000, 18.400, 14.400.

### **Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) (NEB)**

Dieser Marker wurde für die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen verwendet, die durch SDS-PAGE ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und immunhistochemisch analysiert wurden. Die einzelnen Proteine haben folgende Molekulargewichte in Da: 175.000, 80.000, 58.000, 46.000, 30.000, 25.000, 17.000, 7.000.



---

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz
MC_slo_ysc_up	5'-GTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGCTAGCGCGGCC- AGCCGGCCATGGCG-3'
McoTI_Ysc2_lib_lo	5'-ATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCGGCCCCC- GAGGCCGAGCCGCA-3'
MCoTI(SloI)- Bibliothek	5'-GCGCGC CCC GGG GAA AAC CTG TAT TTT CAG TCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG XXX XXX XXX TGC CAG XXX XXX XXX XXX TGC XXX XXX TCC TCC TGC CCA GGT GCT TGC ATC TGC XXX XXX XXX XXX TGC GGC TCG GCC TCG GGG GCC GGA TCC GGT GGC AGC GAA GG-3'
	Codonbezogene Randomisierung der ursprünglichen Aminosäuren mit allen natür- lich vorkommenden Aminosäuren außer Cystein: 100 % K/R 50 % 10 %
	Dabei steht ,X' für A, G, C oder T
MCoTI(SloII) Bibliothek	5'-GCG CGC CCC GGG GAA AAC CTG TAT TTT CAG TCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG XXX XXX XXX TGC XXX XXX XXX XXX TGC XXX XXX TCC TCC TGC CCA GGT GCT TGC ATC TGC XXX XXX XXX XXX TGC GGC TCG GCC TCG GGG GCC GGA TCC GGT GGC AGC GAA GG-3'
	Codonbezogene Randomisierung der ursprünglichen Aminosäuren mit allen natür- lich vorkommenden Aminosäuren außer Cystein: 100 % 50 % 10 %
	Dabei steht ,X' für A, G, C oder T
pct-basic-mid3up	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGCACTCGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC-3'
pct-basic-mid4up	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC-3'
pct-basic-mid5ca-up	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACAGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC-3'
pct-basic-mid6ac-up	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGACGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC-3'
pct-basic-mid10- lang-lo	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGATAACAAATTGAAATATGGC-3'
pct-basic-lang- mid14lo	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATACATAACAAATTGAAATATGGC-3'
pcc-basic-lang- mid14gt-lo	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATGTATAACAAATTGAAATATGGC-3'
pctbasic-mid10lo	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGATAAGCTTTTGTTCGGATCC-3'
pCT-lib-fwd (up)	5'-GTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC-3'
pCT-lib-rev (lo)	5'-ATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCC-3'
pCT-seq-lo	5'-GCGCGCTAACGGAACGAAAAATAGAAA-3'
pCT-seq-neu-up	5'-AGGACAATAGCTCGACGATTG-3'
SOTI-III_wt_up	5'-GAAGATAAATGTTCTCCATCTGGTGCTATTTGTTCTGGTTTTGGTCCA- CCAGAACAATGTTGTTCTGGTGCTTG-3'
SOTI-III-lo	5'-TTGACAAACAAAAATTCTCAAAATTGGATGTGGAACACAAGCACCAG- AACAACATTGTTCTGGTGGACCAAAACC-3'
SOTI-wt-mod-R-A-lo	5'-TTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACAAACAAA- AATAGCCAAAATTG GA-3'
SOTI-III-ol-up	5'-GTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCGAAGATAAATGT-3'
SOTI-III-ol-lo	5'-TCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACAAACAAA-3'

SOTI-MatIK3-mod-R1-A-lo	5'-ATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACACC-GCCAAGACCGCGCCCGAG CATTCAAAACA-3'
SOTI-MatIK3-mod-R2-A-lo	5'-ATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACACC-GCCAAGACCGCGCAGCCC TATTCAAA-3'
SOTI-MatIK3-mod-R3-A-lo	5'-ATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACAC-CGCCAAGAAGCGCCCGCC TA-3'
SOTI-MatIK3-mod-R4-A-lo	5'-ATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACA-AGCCAAGACCGC-3'
SOTI-III_ran_lo (NNK) (Purimex)	5'-AAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACAMNNMNNMNNMNNMNNMNNM-NNMNNMNNMNNAAAGCTTTTGTTCGGATCCTTGACA-3'

## 2.5 Antikörper, Enzyme und Proteine

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-HA-Epitop Antikörper (monoklonal, Maus)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Maus Antikörper Biotin (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Kaninchen Antikörper Biotin (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-cMyc-Epitop Antikörper (monoklonal, Maus)	Abcam plc, Cambridge, UK; Invigate GmbH, Jena
Anti-ST14 Antikörper (polyklonal, Hase)	Abcam plc, Cambridge, UK

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Nukleinsäuren, Enzymen und Proteinen

Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren	Hersteller
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypsin (bovine pancreas)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thrombin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Urokinase (uPA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Faktor Xa	Cellsystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf
Restriktionsendonukleasen	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT, NEB
Taq Polymerase	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT
Taq Polymerase	Arbeitskreis Kolmar, TU Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT
O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT
O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT
Lambda DNA/Eco471 (AvaII) Marker, 13	Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT
Oligodesoxyribonukleotide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SOTI-III Variantenbibliothek	Purimex, Grebenstein
MCoTI(SloI)-&MCoTI(SloII)-Variantenbibliothek	Sloning BioTechnology GmbH, Puchheim

## 2.6 Chemikalien

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Acetonitril HPLC Grade	Carl Roth GmbH & Co KG, BioSolve Group, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Rotiphoese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ampicillin-Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Bacillol plus	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Brillantblau R 250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Boc-Gln-Ala-Arg-pNA	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citronensäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Casaminoacids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Collidin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Life Technologies GmbH, Darmstadt
F-moc geschützte Aminosäuren	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz
Glucose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Galactose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
HCl 37% rauchend	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Lithiumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Methylumbelliferon	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Methylumbelliferylguanidinobenzoat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Nickelchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraffinöl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x), Liquid	Life Technologies GmbH, Darmstadt

---

Phenol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pepton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Polyethylenglycol 8000	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium (R8758)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI-1640 Medium Modified (R7509)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stickstoff flüssig	TU Darmstadt
Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat (SAPE)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Streptomycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sucrose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sulfo-NHS-LC Biotin	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Syntheseharz AmphiSpheres 40 RAM 0.52 mmol/g 75-150 µM	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Syntheseharz TentaGel S AC Gln(Trt) Fmoc	Rapp Polymere GmbH, Tübingen
Trypton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris-Acetat/HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tos-Gly-Pro-Arg AMC HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Merck KGaA, Darmstadt
TWEEN 20	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypsin (0,5 g/L) + EDTA (1g/L) w/o Ca, Mg	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Yeast Nitrogen Base w/o	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Z-Arg-7-AMC HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien, Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) oder Fisher Scientific GmbH (Schwerte) bezogen.

## 2.7 Sonstige Materialien und Geräte

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Hersteller
BD Accuri C6 flow cytometer (Sampler)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Autoklav, Varioklav	Thermo Electron GmbH, Heidelberg
Autoklav, HAST-4-5-6	Zirbus technology GmbH, Bad Grund
Autoklav, V-150	Systec GmbH, Wettenberg
Äkta Basic UV900 P900 Frac 900, Unicorn 3.1 Software	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Basic Meter, pH-Meter	Sartorius AG, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank Inkubator Typ B 5060 EK-CO <sub>2</sub>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank Incucell	MMM Med Center Einrichtungen GmbH, München
BioEdit v7.0.7	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
Biologische Sicherheitswerkbank <i>LaminAir</i> HLB 2460 BS, Klasse II	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Benzamidin Sepharose fast flow	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Beckmann Optima™ LE-80K Ultracentrifuge	Global Medical Instrumentation, Ramsey, USA
CertomatR BS-1 (Inkubationsschüttler)	Sartorius AG, Göttingen
Cell Disruptor	Constant Systems Limited, Daventry Northants, UK
CEM Liberty Peptidsynthesizer	CEM GmbH, Kamp-Lintfort
Chelating Sepharose™ Fast Flow (IMAC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Dynabeads® Streptavidin Trial Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EasyXtal 15 well Platten	QIAGEN GmbH, Leipzig
Elisa 96Well Platten, verschiedene	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Elektrophoresis Power Supply EPS 301 und 601	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Elisareader, GENios™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Feinwaage, Sartorius UniversalU4800P	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage, AX 200	Shimadzu, Weiterstadt
Filtereinheiten Millex FG13	Merck KGaA, Darmstadt

<i>French Pressure Cell Press</i>	SLM Instruments, Inc, Urbana, USA
Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS), MoFlo® Cytometer mit Cyclone Sortiereinheit, Summit® v4.3 Software-Paket	Dako Cytomation, Fort Collins, USA
Gene Pulser® und Pulse Controller	BioRad, München
GelDokumentationssystem, <i>Gel Jet Imager</i>	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelgießkammer, Multiple Gel Caster	Hoefer, Inc., Holliston, USA
Gewebekulturflasche T-75CN, für adhäre Zellen, Schräghals, rote Belüftungskappe (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Glaswaren	SCHOTT AG, Mainz
GS Junior System (454 <i>Sequencing</i> )	454 Life Sciences (Roche), Branford, USA
Herafreezer, - 80 °C Gefrierschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
HiTrap Q HP (Anionenaustauscher)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Hoefer™ DualGel Caster	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HoneyBee 961 dispensing robot	Digilab Genomic Solutions, Holliston, USA
Ilmyac Pumpe Typ 109012	Ilmvac GmbH, Ilmenau
IMAC-Säulen	QIAGEN GmbH, Leipzig
Intelli-Plate™ 96-3 Platten	Art Robins Instruments, Sunnyvale, USA
Kühlschrank	UniEquip GmbH, Martinsried
LD <i>Columns</i> (MACS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Microliterpipetten	Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, Hamburg
<i>MicroBeads</i>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Mikroskop Axioskop mit Durchlicht, Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 16x, Objektive: Plan Neofluar 40x/0,65 Oil; Plan Neofluar 100x/1,25 Oil; Acroplan 4x/0,1; Plan 100x/1,25 Oil	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikrowelle Moulinex	KRUPS GmbH, Offenbach am Main
Mikrotiterplatten 96-well (flach, schwarz)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrotiterplatten 96-well (flach, transparent)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Novablot Apperatur, 2117-250	Pharmacia Lkb Biotechnology Inc., Gaithersburg, USA

Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Operating Manual Freeze Dryer ALPHA 2-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Objektträger (76x26 mm)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Open Top Polyclear™ Centrifuge Tube (14 x 89 mm)	BRADY GmbH, Egelsbach
PyMol™ v0.99	DeLano Scientific LLC., Palo Alto, USA
Plasm 2.04	Biofreesoftware
PCR-Maschinen	Eppendorf, Hamburg/BioRad, München
Pipettierhilfe, Pipetus R -Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PD-10 Säulen mit <i>Sephadex™ G-25</i> Medium	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen, 92x16 mm und 150x20 mm	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Parafilm ® “M” Laboratory Film	American National Can., Chicago, USA
PCR-Gefäße, <i>Multiply</i> R -µStrip 8er-Kette	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Quick Seal™ Centrifuge Tubes (25 x 89 mm)	BRADY GmbH, Egelsbach
Q-Sepharose Fast flow	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Quarzküvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Reagiergefäß 1,5mL/2mL	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Röhrchen 15mL/50mL	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Röhrchen, 50 mL (für Zentrifugation bis 15.500 g)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Seals AirOtop	BioSilta Oy, Oulu, Finnland
Schüttler, Lab-Shaker/Lab-Therm	Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz
Schwenkbecherrotor SW41Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Shimadzu LC-MS	Shimadzu, Weiterstadt
Sigmaplot 11	SPSS Inc., Chicago, USA
Sterilbank, Envircor	ENVAIR Deutschland GmbH, Emmendingen
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Superdex 75 16/60	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
SuperMACS™II Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Syringe Spritzen, 5 mL, 10 mL, 30 mL	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Taumelschüttler, Polymax 2040 und Duomax 1030	Heidolph Elektro GmbH & Co KG
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg



Ultra Yield Flask	BioSilta Oy, Oulu, Finnland
<i>Ultrafree-20</i> Nanopore-Wasser-Anlage	Merck KGaA, Darmstadt
UV-Küvetten, Halb-Mikro 10 mm	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch	Herolab GmbH, Wiesloch
Varian LC920 System	Varian Medical Systems GmbH, Darmstadt
Vertikalrotor VTi-50	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex ® Genie 2	Bender & Hobein GmbH Labortechnik Chemikalien, Bruchsal
Waage, PM 4600	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Waage, Universal	Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage, MilliQ-Synthesis A10	Merck KGaA, Darmstadt
Zentrifuge, (Mikrotiterplatten) 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Multifuge 3 L-R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Eppendorf 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Sigma 3K30	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Sigma 6K15	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zellu Trans Dialysemembran T3 (MWCO 12-14 kDa)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Zweistrahl-Spektralphotometer UV-1650-PC mit UVProbe v 2.20 Software Paket	Shimadzu, Weiterstadt
ZelluTrans Dialysiermembranen	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Geräte, die nicht explizit aufgeführt wurden, gehören zur Grundausstattung eines biochemisch arbeitenden Labors.

## 2.8 Nährmedien

*Escherichia coli*

### **dYT-Medium**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

### **LB-Medium**

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) 10 mM NaCl

---

Zur Sterilisation wurden die Medien 20 min bei 120 °C autoklaviert, wobei im Fall von festen Medien zuvor 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt wurde. Antibiotika wurden den Medien aus konzentrierten Stammlösungen (1000fach) mit Endkonzentrationen von 100 mg/L für Ampicillin und 75 mg/L für Kanamycin zugegeben.

*Saccharomyces cerevisiae*

#### **YPD Medium**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2 % (w/v) Glucose

#### **SDCAA Medium**

2 % (w/v) Glucose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [pH 7,4]

#### **Low-SDCAA Medium**

0,5 % (w/v) Glucose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [pH 7,4]

#### **SGCAA Medium**

2 % (w/v) Galactose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [pH 7,4]

#### **SGCAA-PEG Medium**

2 % (w/v) Galactose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [pH 7,4], 10 % (w/v) Polyethylenglycol 8000

Die hier aufgeführten Medien wurden vor der Verwendung zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert. Hierbei wurden Glucose, Galactose, Yeast Nitrogen Base, Casamino Acids und Antibiotika separat sterilfiltriert und zugesetzt. Von erstellten konzentrierten Stammlösungen (100fach) der Antibiotika wurde den Medien 60 mg/L Ampicillin und 100 mg/L Streptomycin zugesetzt.

## Humane Krebszelllinien

### DMEM-Medium

DMEM-Medium, 10 % (v/v) Fetales Kälberserum, 1 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Pen Strep

Alle Medienbestandteile wurden bei den aufgeführten Herstellern erworben und in der biologischen Sicherheitswerkbank supplementiert.

## 2.9 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösungen und Puffer	Substanz	Menge
Ammoniumacetat-Stammlösung	NH <sub>4</sub> Ac	7 M
Ampicillin-Stammlösung	Ampicillin (Na-Salz) sterilfiltriert	100 mg/mL
Amp-Strep Stammlösung	Ampicillin	6 mg/mL
	Streptomycin	10 mg/mL
AP-Puffer	Tris-HCl pH 9,0	100 mM
	NaCl	100mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
APS-Stammlösung	APS	10 % (w/v)
BCIP-Lösung	BCIP	50 mg/mL in 70 % (v/v) Dimethylformamid
Caesiumchloridgradient - Lösungen		
Lysozym Lösung	Lysozym	10 mg/mL
	Tris pH 8,0	10 mM
Lösung C-I	Glucose	50 mM
	Tris pH 8,0	25 mM
	EDTA	10 mM
Lösung C-II	NaOH	0,2 N
	SDS	1 % (w/v)
Lösung C-III	Kaliumacetat	5 M
	Eisesssig	57,5 mL
	dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL
Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE	Brillantblau R-250 in Methanol	0,2 % (w/v)
	Essigsäure	20 % (v/v)
	Beide Lösungen vor Gebrauch 1:1 mischen.	
Chloramphenicol-Stammlösung	Chloramphenicol	25 mg/mL, sterilfiltriert

dNTP-Lösung für PCR	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Je 2,5 mM
DNA Loading Dye (6x)	Tris-HCl, (pH 7,6)	10 mM
	Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
	Xylencyanol	0,03 % (w/v)
	Glycerin	60 % (v/v)
	EDTA	60 mM
Denaturierungspuffer (inclusion body Isolierung)	Harnstoff	6 M
	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol	1 mM
EDTA-Lösung	EDTA	100 mM
Elutionspuffer (denaturierende IMAC)	Imidazol	500 mM
	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol	1 mM
	Harnstoff	4,5 M
EK-Puffer (Enzymkinetik)	Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	0,01 % (v/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,01 % (v/v)
Ethidiumbromid-Stammlösung	Ethidiumbromid	10 mg/mL
Faltungspuffer	DMSO	10 % (v/v)
	TFE	10 % (v/v)
	Gu-HCl	1 M
	Natriumphosphat-Puffer (pH 7)	50 mM
<i>freezing solution</i>	Glycerin	2 % (v/v)
	Yeast Nitrogen Base	0,67 % (w/v)
	Vor Gebrauch ansetzen und sterilfiltrieren.	
Hoechst-Puffer	Harnstoff	8 M
	TRIS-Base	200 mM
	DTT	200 mM
	SDS	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,15 mM
Hefelysis-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	2 % (v/v)
	SDS	1 % (w/v)

			in aqua bidest.
IPTG-Stammlösung	IPTG	1 M	
	IPTG sterilfiltrieren und bei - 20 °C lagern.		
Kanamycin-Stammlösung	Kanamycin	75	mg/mL, sterilfiltriert
LiAc/DTT Puffer	Lithiumacetat	100 mM	
	1,4-Dithiothreitol	10 mM	
	Nur sterilfiltriert verwenden.		
Laemmli-Puffer (10x)	Tris-HCl	250 mM	
	Glycin	2 M	
	SDS	1 % (w/v)	
Laufpuffer-AE I	Tris-HCl, pH 8	50 mM	
Laufpuffer-AE II	Tris HCl, pH 8	50 mM	
	NaCl	2 M	
NBT-Lösung	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	75 mg/mL in 70 % (w/v) Dimethylformamid lösen	
Nickelchlorid Lösung	NiCl <sub>2</sub>	100 mM	
Phosphat buffered saline (PBS)	NaCl	140 mM	
	KCl	10 mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	
PBST	PBS mit Tween 20	0,05 % (v/v)	
Puffer für Restriktionsendonukleasen (Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT)	Gelb Tris-HCl (pH 7,9)	33 mM	
	Magnesiumacetat	10 mM	
	Kaliumacetat	66 mM	
	Grün Tris-HCl, (pH 7,5)	10 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
	NaCl	50 mM	
Puffer E1 nach Chao <i>et al.</i> <sup>152</sup>	Tris (pH 7,5)	10 mM	
	Sucrose	270 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	
Puffer E2 nach Benatui <sup>154</sup>	Sorbitol	1M	
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM	
Ponceau S-Färbelösung	Ponceau (3-Hydroxy-4-(2-Sulfo-4-(4-Sulphophenylazo)-Phenylazo)-2,7-Naphthalendisulfonsäure)	0,3 % (w/v)	
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)	
	Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)	
Rückfaltungspuffer I	Tris-HCl (pH 8)	50 mM	

	Glycerin	10 % (v/v)
	KCl	100 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	1 mM
	Harnstoff	3,5 M
Rückfaltungspuffer II	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	KCl	100 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	1 mM
Schägger Anodenpuffer	Tris-HCl (pH 8,9)	0,2 M
Schägger Gelpuffer	Tris-HCl (pH 8,45)	3 M
	SDS	0,3 %
Schägger Kathodenpuffer	Tris-HCl	0,1 M
	Tricin	0,1 M
	SDS	0,1 %
SDS-Stammlösung	SDS	10 % (w/v)
Sucrosefarbmarker	D-Saccharose	60 % (w/v)
(DNS Gelelektrophorese)	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Xylencyanol FF	0,1 % (w/v)
		Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)
Sucroselösungen (Sucrosegradienten)	Sucrose	10, 30 und 40 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 8)	100 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	10 mM
T4-DNS-Ligase-Puffer	Tris-HCl (pH 7,8 RT)	400 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	DTT	100 mM
	ATP	5 mM
Taq Puffer	Tris-HCl (pH 8,8)	100 mM
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	25 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
TAE-Puffer (50x)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	50 mM
TBE-Puffer	Tris-Base	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2,5 mM
TE-Puffer (pH 8,0)	Tris-HCl	10 mM

Tris-DTT Puffer	EDTA	1 mM
	Tris-HCl (pH 8.0)	1 M
	DTT	2,5 M
Vor Gebrauch frisch ansetzen und sterilfiltrieren. Lagerung bei - 20 °C bis zu 6 Monate möglich.		
Trypanblaulösung	Trypanblau	4 % (w/v)
Western-Blot Transferpuffer	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)

Soweit nicht explizit aufgeführt, wurden alle Puffer und Lösungen mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt.

### **2.10 Kits**

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System (Promega)

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

---

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### 3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Um Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden und reproduzierbare Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden alle hitzestabilen Geräte durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Lösungen, welche keine thermolabilen Komponenten enthielten, wurden durch autoklavieren (Autoklav von Systec, Programm F10, 20 min bei 121 °C) sterilisiert. Hitzeinstabile Geräte wurden mit Desinfektionsmittel (Bacillol plus, Roth) gereinigt bzw. mit 70 % (v/v) Ethanol ausgewaschen und getrocknet. Lösungen und Puffer mit hitzeinstabilen Bestandteilen wurden als Stammlösungen angesetzt und vor Verwendung durch Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

#### 3.1.2 Bestimmung der Zelldichte

Für die Kultivierung von *Escherichia coli* sowie *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Zelldichte der Kulturen durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Photometer (Eppendorf, Bio Photometer) ermittelt. Als Leerwert wurde das zur Kultivierung genutzte Medium verwendet. Bei Absorptionswerten über 1 wurden Verdünnungen erstellt und der sich ergebende Verdünnungsfaktor in die Berechnung der Zelldichte mit einbezogen. Eine optische Dichte von 1 bei 600 nm entspricht  $1 \cdot 10^8$  Bakterien bzw.  $1 \cdot 10^7$  Hefezellen pro Milliliter Kultur.

#### 3.1.3 Stammhaltung und Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung der verwendeten *Escherichia coli* Bakterienstämme erfolgte in dYT-Medium bei 37 °C im Inkubationsschüttler (Satorius, Centromat BS-1). Den Kulturen wurde im Fall von Plasmid vermittelten Selektionsmarkern entsprechende Antibiotika zugesetzt. Für Medienvolumen bis zu 5 mL wurden Reagenzgläser zur Vermehrung der Bakterien gewählt. Kulturen mit größeren Volumen wurden wie auch die Reagenzgläser mit 180 Umdrehungen pro Minute (U/min) im Inkubationsschüttler kultiviert.

Die verwendeten *Escherichia coli* Bakterienstämme wurden für eine langfristige Nutzung und Lagerung mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert. Häufig verwendete Bakterienstämme wurden nach Kultivierung auf M9-Minimal-Agarplatten ausgestrichen und bei 4 °C gelagert.



---

### 3.1.4 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation

*Escherichia coli* wurden der Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* folgend transformiert.<sup>190</sup> Zur Amplifikation gewünschter Vektoren wurden elektrokompetente Bakterienzellen erzeugt und mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert. Hierfür wurde der benötigte Bakterienstamm in 50 mL dYT-Medium inokuliert, nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 in einem 50 mL Falcon Röhrchen überführt und in der Heareus Multifuge 3L-R sedimentiert (12 min, 4000 U/min, 4 °C). Durch wiederholtes Aufnehmen des Zellpellets in 30, 20 und 10 mL eiskaltem Aqua bidest konnten die Transformation störende Salze ausgewaschen werden. Das Pellet wurde anschließend in dem im Falcon Röhrchen verbliebenen Wasser resuspendiert und 100 µL der Zellsuspension pro Transformation verwendet. Alle Arbeitsschritte sollten hierbei soweit wie möglich auf Eis durchgeführt werden. Für die Transformation der elektrokompetenten Zellen sollten 5-10 µL eines Ligationsproduktes bzw. 1-3 µL eines Plasmids eingesetzt werden. Des Weiteren wurden für die Elektroporation vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten sowie der Gene Pulser (BioRad, München) mit den Einstellungen 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6,25 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0-4,5 ms Zeitkonstante bei Raumtemperatur verwendet. Unmittelbar nach Applikation des Spannungspuls wurde 1 mL dYT-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert und die Zellsuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Regenerationsphase von 1 h bei 37 °C wurde ein Teil der Kultur auf selektiven Agarplatten ausgestrichen bzw. 50 mL selektives dYT-Medium inokuliert.

### 3.1.5 Stammhaltung und Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Vermehrung des verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stamms EBY100 erfolgte in YPD-Medium bei 30 °C und 200 U/min im Inkubationsschüttler. Im Fall eines Plasmid vermittelten Auxotrophiemarkers wurde der Hefestamm in SDCAA/SGCAA-Medium kultiviert. Für Medienvolumen bis zu 5 mL wurden Reagenzgläser zur Vermehrung der Hefen gewählt.

Häufig verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme wurden auf YPD/SDCAA Agarplatten ausgestrichen oder in den entsprechenden Medien bei 4 °C gelagert. Für eine dauerhafte Lagerung wurden die verwendeten Hefestämme oder Bibliotheken drei Tage in Low-SDCAA-Medium kultiviert, sedimentiert, anschließend in *freezing solution* aufgenommen und in Aliquots á 5 · 10<sup>9</sup> Hefezellen bei - 80 °C gelagert.

---

### 3.1.6 Induktion plasmid- und chromosomalkodierter Genexpression in *S. cerevisiae*

Für die Oberflächenpräsentation von Proteinen auf *S. cerevisiae* wurde der pCT-Vektor sowie der Hefestamm EBY100 verwendet. Die für die Oberflächenpräsentation benötigten  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheiten sowie fusionierte Proteine liegen chromosomal- und plasmidkodiert unter der Kontrolle von Gal1/10-Promotoren vor. Für die Expression und Oberflächenpräsentation der Proteine wurden im Fall von Einzelklonen  $1 \cdot 10^7$  Zellen einer in SDCAA-Medium kultivierten Übernachtskultur pelletiert und in 5-10 mL SGCAA Medium aufgenommen. Die Induktion erfolgte dann durch Kultivierung für 1-2 Tage bei 20 °C und 200 U/min.<sup>140</sup> Durch einen Zusatz von 10 % (w/v) PEG 8000 konnte die Expression und Oberflächenpräsentation zusätzlich verkürzt (1-2 d) und signifikant gesteigert werden.<sup>191</sup> Die primäre Induktion von Bibliotheken erfolgt in 500 mL SGCAA-PEG Medium für 1-2 Tage bei 20 °C und 200 U/min. Um die Bibliotheksdiversität abzudecken wurde die zehnfache Zellzahl für die Induktion eingesetzt. In den anschließenden Runden erfolgte diese in 50 mL SGCAA-PEG Medium.

### 3.1.7 Transformation von *S. cerevisiae* durch Elektroporation

Für die Transformation von *S. cerevisiae* in nicht-quantitativem Maßstab wurde nach dem Protokoll von Chao *et al.* verfahren.<sup>152</sup> Hierfür wurden Hefezellen des Stammes EBY100 über Nacht in 5 mL YPD-Medium im Reagenzglas bei 30 °C und 200 U/min inkubiert. Am Folgetag wurden 50 mL YPD-Medium mit Hilfe der Übernachtskultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und bei 30 °C im Inkubationsschüttler bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,3-1,5 kultiviert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ L Tris-DTT Puffer wurde die Kultur weitere 15 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Hefezellen in 50 mL Falcon Röhrchen überführt und in der Heraeus Multifuge 3L-R sedimentiert (5 min, 4000 U/min, 4 °C). Das entstandene Zellpellet wurde anschließen mit 25 mL sowie nach erneuter Zentrifugation mit 1 mL eiskaltem Puffer E1 gewaschen. Die hierbei entstandenen Überstände wurden verworfen und die Zellen schlussendlich in 300 mL eiskaltem Puffer E1 aufgenommen. Für die Transformation wurden 50-100  $\mu$ L der elektrokompenten Hefezellen, 1  $\mu$ g gespalteter Vektor (*backbone*) und 5-10  $\mu$ g *insert*-DNA eingesetzt und gekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten sowie der Gene Pulser (BioRad, München) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Inkubation des Zell/DNA-Gemisches für 5 min auf Eis bei 540 Volt, 25  $\mu$ F, ohne Pulsregler und Raumtemperatur (RT). Direkt im Anschluss wurde ein Gemisch von 1 mL vorgewärmten YPD-Medium zugesetzt, die

---

Zellsuspension in ein 15 mL Falcon Röhrchen überführt und die Küvette mit 1 mL YPD-Medium ausgespült. Zur Regeneration wurde das Transformationsgemisch nun 1 h bei 30 °C im Inkubationsschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Hefezellen pelletiert und in selektivem SDCAA-Medium aufgenommen. Nun konnten Verdünnungsplattierungen sowie Flüssigkulturen erstellt und kultiviert werden.

Für die Erstellung von Hefebibliotheken mit möglichst hoher Transformantenzahl wurde das weiterentwickelte Protokoll nach Benatuil *et al.* verwendet.<sup>154</sup> Hierbei wurden 100 mL YPD-Medium ausgehend von einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 eingestellt und bei 30 °C sowie 225 U/min bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,6 im Inkubationsschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 5 min, 4000 U/min, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet zweimal mit 50 mL eiskaltem sterilem Wasser und einmal mit 50 mL eiskaltem Puffer E2 gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 20 mL LiAc/DTT Puffer aufgenommen und bei 30 °C und 225 U/min für 20 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun erneut zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 5 min, 4000 U/min, 4 °C) und das Pellet nochmals in 50 mL eiskaltem Puffer E2 gewaschen. Die nun sedimentierten hochelektrokompetenten Hefezellen wurden unter Zugabe von Puffer E2 in einem Gesamtvolumen von 1 mL resuspendiert, was einer Zelldichte von  $1,6 \cdot 10^9$  Zellen/mL entspricht und für zwei Elektroporationsansätze á 400 µL Zellsuspension ausreicht. Für das Erstellen großer Bibliotheken ist eine Skalierung der Erstellung elektrokompetenter Hefezellen um den Faktor 15 ohne weiteres möglich. Die Zellen wurden dann bis zum Zeitpunkt der Transformation auf Eis gelagert. Je Transformationsansatz wurden 400 µL der Zellsuspension, 4 µg der gereinigten Vektor-DNA und 12 µg der *insert*-DNA eingesetzt und durchmischt für 10 min auf Eis inkubiert. Für die Elektroporation wurden vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten sowie der Gene Pulser (BioRad, München) mit den Einstellungen 2,5 kV Spannung und 25 µF mit Zeitkonstanten von 3,0 bis 4,5 ms bei Raumtemperatur verwendet. Im Anschluss wurde jeder Transformationsansatz in 8 mL 1:1 1 M Sorbitol und YPD-Medium überführt und für 1 h bei 30 °C und 225 U/min inkubiert. Zur Selektion transformierter Hefezellen wurden die Zellsuspensionen in der Heraeus Multifuge 3L-R sedimentiert (5 min, 4000 U/min, 4 °C) und in 10 mL SDCAA-Medium aufgenommen. Für die Ermittlung der Transformationseffizienz und der Anzahl transformierter Zellen wurden serielle Verdünnungsplattierungen aus der erhaltenen

---

Zellsuspension erstellt und die verbleibenden Zellen in SDCAA-Medium (12 Transformationsreaktionen/L Medium) 48 h bei 30 °C und 225 U/min kultiviert.

### **3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

#### **3.2.1 DNA-Präzipitation aus wässrigen Lösungen durch Ethanol**

Diese Methode dient der Konzentration und Reinigung von DNA. Für die Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, wodurch die Dielektrizitätskonstante zunahm. Dies verringerte die Abstoßung negativ geladener Phosphodiestergruppen und ermöglichte das Fällern der DNA durch Lösungsmittelentzug bei Ethanolzugabe.

Hierbei wird der DNA-haltigen Lösung 1/10 Vol. 7 M Ammoniumacetatlösung und 3 Vol. 98 % Ethanol *p.A.* zugesetzt und nach Durchmischen für 45 min bei -20 °C gefällt. Im Anschluss wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge; 13.200 U/min, 30 min, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen und bei 37 °C getrocknet. Das Pellet wurde nun im gewünschten Volumen autoklaviertem, demineralisiertem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

#### **3.2.2 Reinigung von DNA-Lösungen mittels Phenol/Chloroform Extraktion**

Für die weitere Reinigung und Abtrennung hydrophober Kontaminationen aus DNA-haltigen Lösungen wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Der Probe wurde hierfür 1 Vol. Phenol zugesetzt, die so entstandene Lösung gründlich durchmischt und zur Phasentrennung anschließend zentrifugiert (TZ, 13.000 Upm, 5 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, mit 1 Vol. Phenol/Chloroform durchmischt und wiederholt zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Chloroform Extraktion, welche analog den zuvor beschriebenen Extraktionen durchgeführt wurde, unterzogen. Hierbei sollten Phenolreste entfernt werden. Im Anschluss wurde die wässrige Phase wie unter 3.2.1 beschrieben mit Ethanol gefällt, um eine bestmögliche Reinigung der DNA zu erzielen.

#### **3.2.3 Agarosegelelektrophorese**

Diese Methode wurde zur Auftrennung doppelsträngiger DNA nach Größe, Ladung und Form im elektrischen Feld genutzt. Hierfür wurden horizontal Agarosegele mit Agarosekonzentration von 1-2 % (w/v) (Agarose in TBE/TAE-Puffer) und 0,5 µg/mL

---

Ethidiumbromid in einer Flachbett-Gelkammer (100 x 7 x 0,5 mm) gegossen und ein gewünschter Taschenkamm eingesetzt. Die Agarose wurde zuvor in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht und Ethidiumbromid erst nach Abkühlen auf ca. 60 °C zugesetzt. Das erstarrte Gel wurde anschließend vollständig mit dem gewählten Puffer überschichtet, der Taschenkamm entfernt und die Proben nach Zusatz von Sucrosefarbmarker (1/5 Vol.) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde anschließend mit einer Spannung zwischen 40 und 130 V für 30 bis 60 min durchgeführt (5 – 10 V/cm Feldstärke). Ethidiumbromid interagiert mit den organischen heteroaromatischen Basen der DNA und kann im Wellenlängenbereich von 254-366 nm angeregt werden.<sup>192,193</sup> Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten somit durch UV-Durchlicht (302 nm) analysiert und dokumentiert. DNA-Fragmentlängenstandards (DNA-Konzentration: 100 ng/µL) wurden zur Längen- und Konzentrationsbestimmung der resultierenden DNA-Banden verwendet.

### **3.2.4 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen**

Die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen wurde mit Hilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) durchgeführt. DNA gewünschter Größe wurden unter Verwendung eines unbenutzten Skalpell sowie der geringstmöglichen Bestrahlung durch UV-Licht aus der Gelmatrix isoliert. Die folgenden Schritte wurden dem Protokoll der Herstellerfirma entsprechend für beide Reinigungsmethoden durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mit 50 µL demineralisiertem, autoklaviertem Wasser oder TE-Puffer eluiert.

### **3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

#### *3.2.5.1 Analytische und semi-präparative Extraktion von Plasmid-DNA*

Grundlage der Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* ist die alkalische Lyse der Bakterienzellen. Zunächst werden Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in einem RNase-haltigen Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe eines Lyse-Puffers, der NaOH sowie SDS enthält, werden die Zellen lysiert und die vorliegende DNA denaturiert. Durch Zugabe eines Neutralisations-Puffers erfolgt nun ein Absenken des pH-Werts, wodurch genomische DNA und Proteine ausfallen, während Plasmid-DNA aufgrund ihrer topologischen Eigenschaften in Lösung bleibt. Durch Zentrifugation können nun alle unlöslichen Bestandteile abgetrennt und die DNA durch eine Affinitätsmatrix gereinigt werden.

---

Die analytische Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) durchgeführt. Hierfür wurden 3-5 mL einer Übernachtskultur verwendet. Die Extraktion erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers. Für die semi-präparative Isolierung wurden 50 mL Übernachtskultur sedimentiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 12 min, 4000 U/min, 4 °C) und mit Hilfe des *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* (Promega) extrahiert.

#### 3.2.5.2 Präparative Extraktion und Reinigung von Plasmid-DNA

Für die präparative Extraktion von Plasmid-DNA wurde eine 1 L Übernachtskultur pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 63 mL Lösung C-I aufgenommen und 7 mL frische Lysozym-Lösung zugesetzt (5 min, RT). Nach Zugabe von 88 mL der Lösung C-II und schonendem Invertieren erfolgte eine Inkubation für 5-10 min (RT). Anschließend wurden 66 mL der Lösung C-3 zugegeben, die Probe kräftig durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (4.400 U/min, 15 min, 4 °C, Heraeus Multifuge 3 L-R) wurde die ausgefallene genomische DNA sowie Proteine sedimentiert und der Überstand durch ein Filterpapier filtriert. Die Probe wurde dann mit 0,6 Vol. Isopropanol vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation konnte die ausgefallene Plasmid-DNA präzipitiert werden. Das entstandene Pellet wurde anschließend mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen, nochmals sedimentiert und getrocknet (50 °C, Heizblock).

Die weitere Reinigung und Abtrennung von linearisierter DNA sowie RNA wurde durch einen Caesiumchloridgradient erzielt. Aufgrund unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeiten können hierbei Verunreinigungen abgetrennt werden. Hierfür wurde das getrocknete Pellet in 25 mL TE-Puffer aufgenommen, der Lösung je Milliliter 1 g CsCl zugesetzt und durchmischt, bis das Salz vollständig in Lösung vorlag. Nun wurden der Probe 0,8 mL der Ethidiumbromid-Stammlösung je 10 mL Lösung zugegeben, durchmischt und in ein *Quick Seal*-Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem die Probe mit Paraffinöl überschichtet und versiegelt vorlag, konnte die Zentrifugation in der Beckmann Optima™ LE-80K Ultracentrifuge im Vertikalrotor VTI-50 (45.000 U/min, 20 °C, 36 h) erfolgen. Nach Entnahme des Zentrifugenröhrchens wurde die Bande der *supercoiled* Plasmid-DNA durch seitliche Punktion abgezogen.

Ethidiumbromid wurde durch mehrfaches Ausschütteln mit Hilfe von Isoamylalkohol im Scheidetrichter und wiederholter Dialyse (3x) gegen 5 L TE-Puffer entfernt. Die Lösung

---

wurde dann nach Zusatz von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. 99,8 % EtOH gefällt (1 h, - 20 °C) und pelletiert (4.400 U/min, 15 min, 4 °C, Heraeus Multifuge 3 L-R). Die im Anschluss getrocknete Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 100 µg/mL eingestellt. Der Probe wurde anschließend DNase-freie RNase zugegeben (10 µg/mL Endkonzentration) und in ein Ultrazentrifugenröhrchen mit 4 mL vorgelegter 1 M NaCl-Lösung überführt. Nach Überschichten der Probe mit Paraffinöl erfolgte die Zentrifugation in der Beckmann Optima™ LE-80K Ultracentrifuge im Schwenkrotor SW-41 (35.000 U/min, 20°C, min. 6 h). Das im Anschluss getrocknete Pellet wurde im gewünschten Volumen Aqua bidest oder TE-Puffer aufgenommen.

### **3.2.6 Isolierung von Plasmid- sowie chromosomaler-DNA aus *S. cerevisiae***

Für die Extraktion von Plasmid- und chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* wurden 3-5 mL einer Übernachtskultur sedimentiert (TZ, 13.000 U/min, 3 min, RT). Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µL Hefe-Lysispuffer aufgenommen und der Suspension 200 µL Phenol sowie 0,3 g Glaskugeln (d 0,5 mm) zugesetzt. Durch kräftiges Mischen (10 min, Vortexer) der Suspension wurden die Hefezellen aufgeschlossen und alle unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die wässrige klare obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat sowie 2,5 Vol. 99,8 % EtOH vermischt und zentrifugiert (TZ, 10 min, 13.000 U/min, RT). Das entstandene DNA-Pellet wurde anschließend mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen und der Niederschlag nach wiederholter Zentrifugation getrocknet. Die so isolierte DNA konnte nun im gewünschten Volumen Aqua bidest oder TE-Puffer aufgenommen werden.

### **3.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen**

Durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen bestimmen. Gemessen wurde im Spektralphotometer (UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu) gegen Wasser oder TE-Puffer in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Hierbei entsprach eine  $oD_{260}$  von 1 einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA, 35 µg/mL RNA oder 33 µg/mL ssDNA. Durch eine zweite Messung bei 280 nm können Rückschlüsse auf das Maß der Reinheit der DNA-haltigen Lösung getroffen werden. Entspricht das Verhältnis  $oD_{260}/oD_{280}$  einem Wert von 2 liegt die



---

Probe proteinfrei vor. Werte kleiner als 2 zeigen an, in welchem Maße die Lösung von Proteinen verunreinigt ist.

### **3.2.8 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation**

Für die Erstellung großer Variantenbibliotheken in *S. cerevisiae* wurden große Mengen hochreiner und linearisierter Plasmid-DNA benötigt. Hierfür wurde das Vektorfragment nach Restriktion des Plasmids mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation gereinigt. Zunächst wurde mit Hilfe einer Gradienten-Mischkammer ein Sucrose-Gradient (10-30 % (w/v)) in einem Zentrifugenröhrchen (Open Top Polyclear™ Centrifuge Tube) erstellt. Anschließend wurden maximal 200 µg verdauter Plasmid-DNA in einem maximalen Probenvolumen von 200 µL vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und das Röhrchen bis zum Rand mit Paraffinöl überschichtet. Nach Austarieren des Gradienten auf etwa 0,1 mg wurde der Schwenkbecherrotor SW41TI beladen und in der Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge im Vakuum zentrifugiert (30.000 Upm, 21 h, 15 °C). Im Anschluss wurde der Gradient dem Rotor vorsichtig entnommen und nach Punktion des Röhrchens mit Hilfe einer Kanüle (0,55 x 25 mm) Fraktionen von ca. 500 µL gesammelt. Die Proben wurden dann mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.3) analysiert und die gewünschten Fraktionen mit Ethanol präzipitiert (3.2.1.).

### **3.2.9 Hochdurchsatz Amplicon Sequenzierung – 454-Sequenzierung**

In dieser Arbeit wurde die Methode der Hochdurchsatz Amplicon Sequenzierung zur Charakterisierung von Miniproteinvariantenbibliotheken in *S. cerevisiae* genutzt. Nach Erstellung der Bibliotheken (3.1.7) wurden die in Hefe durch homologe Rekombination generierten Plasmide isoliert (3.2.6). Im Anschluss konnte die zu sequenzierenden Bereiche mittels PCR (3.3.2) unter Verwendung flankierender Oligonukleotide amplifiziert werden. Hierbei wurde an die PCR-Produkte (ca. 400 bp) ein *Multiplex Identifier* (MID) fusioniert, durch den eine spätere Zuordnung der Sequenzen erfolgen konnte. In einer zweiten Emulsions-PCR wurden in Tröpfchen (Mikroreaktoren) einzelne linear vorliegende DNA-Fragmente durch spezifische Oligonukleotide an Partikel fusioniert und amplifiziert. Nach Aufbrechen der Emulsion liegen die DNA-Fragmente gebunden an spezifischen Partikeln vor und können in Folge einer Konzentrationsbestimmung in definierten Mengen für die anschließende Sequenzierung eingesetzt werden. Zur Vorbereitung der Proben und anschließende Sequenzierung wurden Zubehörsätze (Kit) der Firma Roche dem Benutzerhandbuch entsprechend verwendet. Für die Sequenzierung



---

wurde das GS Junior System der Firma Roche eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des GS Junior System *Software Package* v2.7, Jemboss (v. 1.5), jalview (v. 2), muscle (v. 3.8.31) und in 'R' programmierten Makros.

### **3.3 Enzymatische Manipulation von DNA**

#### **3.3.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktion von Plasmid-DNA wurde unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen für das gewählte Enzym durchgeführt. Im Fall einer simultanen Spaltung mit mehreren Restriktionsendonukleasen wurden die Pufferbedingungen so gewählt, dass alle Enzyme nach Angaben des Herstellers mindestens 50 % Aktivität aufwiesen. Konnte ein simultaner Verdau aufgrund von abweichenden Puffer- und Temperaturbedingungen nicht durchgeführt werden, erfolgte eine serielle Restriktion unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Für die Restriktionsansätze wurde eine Endkonzentration von 100 ng/ $\mu$ L Plasmid-DNA gewählt und 1-2 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA eingesetzt. Analytische Spaltungen wurden für 1-2 h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, präparative Ansätze in der Regel über Nacht.

#### **3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente *in vitro*.<sup>194-196</sup> So können aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv gewünschte DNA-Matrizen mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) erzeugt werden. Zu Beginn wird durch Erhitzen (96 °C) doppelsträngige DNA-Matrize (*dsDNA*) zu einzelsträngiger DNA (*ssDNA*) überführt (Denaturierung). Im zweiten Schritt lagern sich durch langsames Absenken der Temperatur (52 °C) Primer spezifisch an die DNA-Matrize (Primerhybridisierung) und flankieren den zu amplifizierenden Bereich der DNA. Schließlich werden die Primer komplementär zur ursprünglichen Matrizen-DNA durch eine thermostabile Polymerase verlängert (Elongation). Eine unspezifische Primerhybridisierung wird durch Verwendung hoher Temperatur (72 °C) während der Elongation verringert. Durch Wiederholung dieses Zyklus (30x) kann das von Oligonukleotiden flankierte DNA-Fragment spezifisch exponentiell amplifiziert werden.

---

Dem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL wurden ca. 5-10 ng Matrizen-DNA, 10 pmol eines jeden Oligonukleotids, 5 µL zehnfach Taq DNA Polymerasepuffer und 0,2 mmol dNTPs zugesetzt. Um die Evaporation des Reaktionsansatzes zu verhindern, wurde das Gefäß mit Paraffinöl überschichtet. Nach zweiminütiger Inkubation bei 98 °C erfolgte die Zugabe von 1 µL Taq DNA Polymerase. Durch primäre Denaturierung der Matrize (Hot-Start-PCR) wurde die Nebenproduktbildung verringert und die Spezifität der Reaktion erhöht.<sup>197</sup>

Temperaturen und Dauer der Reaktionsschritte sowie Anzahl der PCR-Zyklen wurden entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes gewählt. Dies wurde zusätzlich durch Länge und Basenzusammensetzung der Primer sowie der gewählten Polymerase beeinflusst. In der Regel erfolgte die Elongation der DNA-Matrize bei 72 °C für 60 s je Kilobase. Die Schmelztemperatur  $T_M$  der gewählten Primer wurde mit Hilfe der Formel 1 berechnet, welche die Oligonukleotidlänge (n) sowie den relativen G/C-Gehalt (% G/C) berücksichtigt:

$$(1) \quad T_M[^\circ\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n}$$

Ausgehend von der ermittelten Schmelztemperatur konnte nun die optimale Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) nach Formel 2 berechnet werden.

$$(2) \quad T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Hierbei stehen  $T_{M1}$  und  $T_{M2}$  für die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide. Eine Denaturierung der DNA-Fragmente und Primer erfolgte für 30 s bei 96 °C in allen Zyklen der PCR.

### 3.3.3 Kolonie-PCR von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Durch die Methode der Kolonie-PCR ist es möglich, Bakterien- und Hefekolonien nach gewünschten DNA-Fragmenten zu durchmustern. Im Fall von *E. coli* werden definierte Einzelklone durch einen verlängerten Denaturierungsschritt (10 min, 96 °C) aufgeschlossen und die freigesetzte DNA durch PCR (3.3.2) mit spezifischen Oligonukleotiden auf definierte DNA-Fragmente überprüft. Die Zugabe der Polymerase erfolgte hierbei erst nach Aufschluss der Bakterien. Hefezellen hingegen wurden aufgrund erhöhter Hitzestabilität in der Regel nicht durch Erhitzen aufgeschlossen. Einzelklone wurden hierfür im 5 mL Maßstab über Nacht kultiviert, die DNA wie unter 3.2.6 beschrieben isoliert und als Matrizen-DNA für eine PCR eingesetzt.

---

### **3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden**

#### **3.4.1 Expression humaner Matriptase-1 (MT-SP1) in *E. coli***

Hierfür wurden elektrokompetente *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP Zellen mit dem Plasmid pET42dest\_His-Matriptase\_(cd)596-855 transformiert (3.1.4) und Einzelklone durch die im Medium enthaltenen Antibiotika Chloramphenicol (25 µg/mL) und Kanamycin (75 µg/mL) selektiert. Für die Expression humaner Matriptase-1 wurde 1 L selektives dYT-Medium mit Hilfe einer Übernachtskultur (37 °C, 180 U/min, 50 mL) eines Einzelklons auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und bei 37 °C sowie 180 U/min bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 kultiviert. Durch Zugabe von 1 mL 1 M IPTG konnte die Expression humaner Matriptase-1 induziert werden. Nach sechsständiger Inkubation bei 37 °C sowie 180 U/min wurden die Zellen durch Zentrifugation in der Heraeus Multifuge 3L-R (4.000 U/min, 15 min, 4 °C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 35 mL PBS aufgenommen und mittels *French-Press*® aufgeschlossen bzw. bei - 80 °C gelagert.

#### **3.4.2 Zellaufschluss von *E. coli* mittels French-Press®**

Die Zellsuspension wurde unter hohem Druck durch ein Ventil gepresst, wodurch bei anschließender Entspannung Scherkräfte entstehen und die Zellen aufbrechen. Die vorgekühlte 4 °C kalte Bombe wurde mit Zellsuspension gefüllt und im hydraulischen Hebearm der *French-Press*® arretiert. Die Probe wurde unter Einwirkung von 1.200 psig (ca. 8,3 MPa) aufgeschlossen. Für einen vollständigen Aufschluss der Zellsuspension wurde der Vorgang fünfmal wiederholt.

#### **3.4.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Methode der SDS-PAGE wurde zur Analyse von Proteingemischen verwendet. Durch Zugabe des Detergenz Natrium-Dodecylsulfat und Aufkochen der Probe wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und deren Ladung maskiert. Anschließend erfolgte eine ihrer Größe entsprechende Auftrennung im elektrischen Feld.<sup>198</sup> Für das simultane Gießen von 5-10 Polyacrylamidgelen wurde ein Gießstand (Multiple Gel Caster, Hoefer) verwendet. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Kathoden sowie Anodenpuffer überschichtet.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 5 Gele nach Schagger et al.<sup>198</sup>

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	20 mL	1,6 mL
Schagger Gelpuffer	10 mL	3,1 mL
H <sub>2</sub> O	-	7,6 mL
10 % APS	100 µL	100 µL
TEMED	60 µL	60 µL

Die Probe wurde zuvor mit 1/5 Vol. *Hoechst*-Puffer versetzt, 10 min bei 99 °C denaturiert, zentrifugiert (TZ, 1 min, 13.000 U/min, RT) und die Taschen des Gels mit Marker (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*; Mbi Fermentas GmbH, ST. LEON-ROT) sowie den Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte mit 35 mA und maximaler Spannung für ca. 1,5-2 h. Nach Durchlauf des im *Hoechst*-Puffer enthaltenen Bromphenolblau wurde die Elektrophorese beendet. Die Visualisierung der nach Größe aufgetrennten Proteine erfolgte durch unspezifische Färbung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brillant Blau R-250.<sup>199</sup> Hierfür wurde das Gel 10-15 min schüttelnd in 20 mL Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel durch Aufkochen in Wasser entfärbt und dokumentiert.

#### 3.4.4 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (*Western Blot*)

Die Methode des *Western Blot* wird zum Nachweis sehr geringer Proteinmengen verwendet. Zunächst werden hierfür Proteingemische ihrer Größe entsprechend aufgetrennt (3.4.3) und mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Im Anschluss können geringste Mengen an Protein auf der Membran durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.<sup>200-202</sup> Hierfür werden 14 Filterpapiere in der Größe des Polyacrylamidgels mit *Western Blot* Transferpuffer getränkt und sieben auf die Graphitanode der Novoblot-Apparatur (Pharmacia Biotech) gelegt. Nachdem eine in Puffer getränkte Nitrozellulosemembran in der Größe des Polyacrylamidgels auf die Filterpapiere aufgebracht wurde, konnte das Gel in feuchtem Zustand überführt werden. Gefolgt vom Übersichten mit sieben weiteren puffergetränkten Filterpapieren konnte die Graphitkathode der Apparatur aufgesetzt werden und der Proteintransfer für ca. 1 h bei einer konstanten Spannung von 10 V erfolgen.

Für den Nachweis membrangebundener Proteine wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in PBS mit 3 % Milchpulver (w/v) für 1 h schüttelnd bei RT oder über Nacht bei 4 °C gesättigt und anschließend dreimal je 10 min mit 20 mL PBST gewaschen. Die Membran wurde dann 2 h in 30 mL der ersten

---

Antikörperlösung (Primärantikörper 1:5.000, 3 % (w/v) Milchpulver in PBS) auf einem Taumelschüttler inkubiert. Antikörperlösung II (Sekundärantikörper alkalische Phosphatase Fusion 1:5.000, 3 % (w/v) Milchpulver in PBS) wurde nach drei Waschschritten mit jeweils 30 mL PBST für 5 min zugegeben und erneut 2 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBST, dreimal mit PBS und einmal mit H<sub>2</sub>O für jeweils 5 min gewaschen. Zur Visualisierung des *Western Blots* wurde die Nitrozellulosemembran mit AP-Puffer überschichtet und 12,5 µL NBT sowie 75 µL BCIP zugesetzt. Nach Inkubation auf einem Taumelschüttler wurde die Farbreaktion durch mehrfaches Waschen mit PBS nach Auftreten von Banden abgestoppt, getrocknet und durch Scannen dokumentiert.

#### 3.4.5 Konzentrationsbestimmung und Lagerung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurde photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm ermittelt. Da aromatische Aminosäuren (W, Y, F) sowie Disulfidbrücken (C) Licht dieser Wellenlänge absorbieren, kann durch die Formel (3) der molare Extinktionskoeffizient ermittelt und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (4) die Proteinkonzentration berechnet werden.<sup>203</sup>

$$(3) \quad \varepsilon(280)(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = (\#W)(5500) + (\#Y)(1490) + (\#C)(125)$$

$$(4) \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

#### 3.4.6 Dialyse

Die Methode der Dialyse wird für den Pufferaustausch von Proteinlösungen verwendet. Durch die Wahl der Ausschlussgrenze des Dialyseschlauchs können Moleküle, die kleiner als der *molecular weight cut-off* (MWCO) sind, abgereichert werden. Für die Rückfaltung humaner Matriptase-1 mittels Dialyse wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 12-14 kDa gewählt (ZelluTrans Dialysemembran T3, Fa. Roth). Die Proben wurde jeweils gegen ein Puffervolumen, das mindestens dem vierzigfachen des Probenvolumens entsprach, zwei- bis dreimal für mindestens 2 h oder über Nacht (4 °C, rührend) dialysiert.

#### 3.4.7 Biotinylierung von Proteinen

Durch das Verfahren der Biotinylierung ist es möglich, Proteine spezifisch mit Biotin-Molekülen zu konjugieren. Da Avidin sowie Streptavidin außerordentlich hohe Affinität zu Biotin aufweisen, können biotinylierte Proteine mittels Avidin beschichteter Partikel aus Proteinlösungen isoliert werden. Außerdem ermöglicht diese Interaktion den

---

spezifischen Nachweis von Biotin-markierten Proteinen auf Oberflächen durch Konjugate bestehend aus Fluoreszenzfarbstoff und Streptavidin.<sup>204</sup> Frei zugängliche Aminogruppen, welche am N-Terminus von Proteinen sowie an der Seitenkette der Aminosäure Lysin vorliegen, bilden durch die Reaktion mit Sulfo-NHS-LC-Biotin eine neue Amid-Bindung aus. Für die Reaktion wird das Sulfo-NHS-LC-Biotin im fünf- bis zehnfachem molaren Überschuss eingesetzt. Das gewünschte Protein sowie das Sulfo-NHS-LC-Biotin wurden in PBS gelöst und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Überschüssiges Biotin sowie die Sulfo-NHS Abgangsgruppe wurden anschließend mit Hilfe einer PD-10 Säule, welche eine Art Größenausschlusschromatographie darstellt, abgetrennt. Die Biotinylierung des Proteins wurde nun durch einen HABA/Avidin Test überprüft.<sup>205</sup> Die Reinigung der Reaktionslösung mittels PD-10 Säule und der Nachweis der Biotinkopplung (HABA/Avidin Test) wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Im Idealfall sollte ein gekoppeltes Biotinmolekül je Protein vorliegen. Die nun mit Biotin markierten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

#### **3.4.8 Fmoc basierte Festphasenpeptidsynthese (SPPS)**

Die Methode der Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis* – SPPS), basierend auf einer C-terminalen, kovalent am Syntheseharz gekoppelten, durch einen Linker abspaltbaren Aminosäure, wurde von Merrifield entwickelt.<sup>206</sup> Die linearen Vorstufen der in dieser Arbeit verwendeten und isolierten Miniproteine wurden durch die Methode der Fmoc basierten Festphasenpeptidsynthese an der Festphase (Resin-Harz) erzeugt.<sup>207</sup> Das AmphiSpheres 40 RAM 0.52 mmol/g 75-150 µMol Syntheseharz wurde für die Assemblierung aller MCoTI-Derivate beziehungsweise das TentaGel S AC Gln(Trt) Fmoc Resin für alle SOTI-Derivate verwendet. Für die Synthese der Peptide wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren am CEM Liberty® Peptidsynthesizer eingesetzt. Hierbei sind die N- $\alpha$ -Aminogruppen und die funktionellen Seitengruppen der Aminosäuren durch orthogonale Schutzgruppen abgeschirmt. Nur durch für die Klasse der Schutzgruppen spezifische Abspaltungsbedingungen können die reaktiven Gruppen der Aminosäuren entschützt werden.<sup>208</sup> Durch das Abspalten der N- $\alpha$ -amino Schutzgruppe und Koppeln einer weiteren Aminosäure wird das Peptid in Richtung N-Terminus verlängert. Durch Wiederholung dieses Zyklus (Kopplung/Entschütung) erfolgte die Synthese der linearen Vorstufen. Alle für die Reaktion benötigten Reagenzien und Lösungsmittel können durch Waschen und Filtration nach jedem Schritt entfernt

---

werden. Das vollständig geschützte lineare Peptid kann anschließend durch Acidolyse von der Festphase unter Verlust der Schutzgruppen hydrolysiert werden. Nach Eigenschaft des verwendeten Linkers liegt das Peptid nach Abspaltung mit Säure-, Amid- oder anderer C-terminaler Funktionalität vor.

Der Synthesizer wurde hierfür mit den benötigten Reagenzien sowie Lösungsmitteln bestückt und programmiert. Vor Synthesebeginn wurde das Harz zunächst für 1 h in DMF und 1 h in DCM bei RT geschüttelt, wodurch ein Quellen der Partikel erfolgen konnte und eine maximale Anzahl an Kopplungsstellen vorlagen. Nach vollständiger Synthese wurde das Harz dreimal mit DCM und mehrfach mit MTBE gewaschen und anschließend im Exsikkator getrocknet sowie gelagert. Eine Abspaltung des Peptids erfolgte durch Zugabe eines Abspaltungscocktails (94 % (v/v) TFA, 2 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 2 % (m/v) Dithiothreitol (DTT), 1 % (v/v) Triethylsilan, 1 % (v/v) Anisol). Nach Fällung des Rohpeptids in methyl-tert-butyl Ether wurde das Pellet in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (2:8, v/v) aufgenommen, lyophilisiert sowie mittels RP-HPLC und LC-MS analysiert.

### **3.4.9 Oxidative Faltung der chemisch synthetisierten Miniproteine**

Die für diese Arbeit synthetisierten Miniproteine lagen nach Abspaltung vom Syntheseharz als lineare Polypeptide ohne Sekundär- und Tertiärstruktur ( $\beta$ -Faltblätter, Disulfidbrücken) vor. Für die Ausbildung dieser Strukturen und der damit verbundenen biologischen Aktivität wurden die Peptide in ein hierfür entwickeltes Faltungssystem überführt.<sup>181</sup> Im semipreparativen Maßstab wurden Peptide mit Konzentrationen von 10 mg/mL im Faltungspuffer (10 % v/v DMSO, 10 % (v/v) TFE, 1 M Gu-HCl, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7) gelöst und für 1-7 d bei RT geschüttelt. Die Reaktion wurde durch direktes Einspritzen in eine RP-HPLC oder LC-ESI-MS abgestoppt und analysiert. Die Aufarbeitung der Faltungsprodukte erfolgte dann mittels semipreparativer HPLC.

### **3.4.10 Reinigung von Proteinen mittels Chromatographie**

#### *3.4.10.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)*

Für die Methode der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie wird die Interaktion von Nitrilotriessigsäure-Molekülen (NTA) an der Oberfläche einer Sepharosematix mit multivalenten Metallionen genutzt.<sup>209,210</sup> Aufgrund dieser Funktion kann eine Komplexbildung durch basische Seitenketten von Aminosäuren erfolgen, wodurch



---

Proteine immobilisiert werden können. Wird nun ein Affinitäts-Epitop bestehend aus sechs Histidinen rekombinant an ein Protein fusioniert, kann dieses reversibel an eine mit  $\text{Ni}^{2+}$ -komplexierte Säulenmatrix gebunden und dadurch aus einem Proteingemisch isoliert werden. Eine Elution des Fusionsproteins kann im Anschluss durch steigende Imidazolkonzentrationen erfolgen, welche einen Ligandenaustausch induzieren.

Die Reinigung von *inclusion bodies* erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. IMAC-Säulen mit 2-3 mL Chelating Sepharose™ Fast Flow wurden hierfür zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und durch Zugabe von 10 mL einer 100 mM  $\text{NiCl}_2$ -Lösung mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladen. Nach zwei erneuten Waschschritten mit 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  wurde die Säule mit 20 mL Denaturierungspuffer equilibriert. Die zuvor in Denaturierungspuffer aufgenommenen *inclusion bodies* wurden dann nach Probenauftrag immobilisiert und im Anschluss zweimal mit 10 mL Denaturierungspuffer gewaschen. Im Anschluss wurde eine Elution durch Zugabe eines imidazolhaltigen Elutionspuffers (dreimal 10 mL) erzielt. Gesammelte Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Reinigung der Säule erfolgte durch Waschen mit 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$  und Entfernen der  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen durch Zugaben von 10 mL 100 mM EDTA-Lösung. Im Anschluss wurde die Säule in 20 % (v/v) Ethanol bei 4 °C bis zu einer erneuten Verwendung gelagert.

#### 3.4.10.2 Ionenaustauschchromatographie

Das Verfahren der Ionenaustauschchromatographie nutzt die kompetitiven Wechselwirkungen geladener Proteine zu Salzionen für eine Reinigung aus. Der isoelektrische Punkt eines Proteins bestimmt die Wahl der Säulenmatrix (Anionen-/Kationenaustauscher) der durchzuführenden Chromatographie. Für die Reinigung humaner Matriptase-1 wurde ein Anionenaustauscher mit einer Q-Sepharose als Säulenmatrix (HiTrap Q HP 1 mL) gewählt und mit Hilfe eines FPLC Äkta Basic Modells durchgeführt. Die Säule wurde zunächst gereinigt und mit mindestens 10 mL Laufpuffer-AE I equilibriert. Nach Probenauftrag und Waschen der Säule mit 10 mL Laufpuffer-AE I wurde das gebundene Protein durch einen bis auf 1 M linear ansteigenden NaCl-Gradienten über 30 min mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Eluierte Proteine wurden fraktioniert gesammelt und anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Säule wurde anschließend mit 25 mL 100 % Laufpuffer-AE II gereinigt und in 20 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gelagert.



---

#### 3.4.10.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Durch das Verfahren der Gelfiltrationschromatographie (GFC) werden Moleküle entsprechend ihrem hydrodynamischen Volumen separiert. Mit Hilfe einer mobilen Phase (Puffer) kann ein heterogenes Probengemisch über eine stationäre poröse Phase (Bsp.: Superdex 75 16/60 Säule) aufgetrennt werden. Für kleinere Moleküle liegen größere Diffusionsräume vor als für größere, wodurch eine spätere Elution erfolgt. Eine zeitlich gestaffelte Separierung der heterologen Analyten der Probe kann auf diese Weise erzielt werden.

#### 3.4.10.4 RP-HPLC

Durch das Verfahren der *Reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC) können Substanzen aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizität und damit korrelierender wechselnd starker Interaktion mit der Säulenmatrix (stationäre Phase) durch Lösungsmittelgradienten (mobile Phase) getrennt werden. Durch die auf Kieselgel (Trägermaterial) gekoppelten Alkylreste (C2-C18) werden Substanzen mit hoher Hydrophobizität stark gebunden und können durch Gradienten organischer Lösungsmittel eluiert werden.

Analytische RP-HPLC wurde unter Verwendung des Varian LC920 Systems mit einer Phenomenex Synergi 4 $\mu$  Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 4  $\mu$ m, 80 Å) Säule mit linearen Wasser/Acetonitril Gradienten und einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Für semi-preparative PR-HPLC wurde das Varian LC 940 System ausgestattet mit einer axia-packed Phenomenex Luna C18 (250 x 21.2 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) Säule mit linearen Wasser/Acetonitril Gradienten und einer Flussrate von 18 mL/min. Als Lösungsmittel wurden Eluent A (0,1 % TFA) und Eluent B (90 % aq Acetonitril, 0,1 % TFA) genutzt. Nach isokratischer Elution (10 % Eluent B für 2 min (analytischer Maßstab) oder 5 min (semi-preparativer Maßstab) folgte ein linearer Gradient von 10→60 % B oder 10→80 % B über jeweils 20 min. Die Probendetektion erfolgte während aller Versuche bei 220 und 280 nm.

#### 3.4.11 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen mittels LC-MS

Die Aufklärung des Molekulargewichts synthetisierter und gefalteter Proteine erfolgte durch LC-MS. Die Analyse wurde unter Verwendung des Shimadzu LC-MS 2020 Systems durchgeführt. Ausgestattet mit einer Phenomenex Jupiter C4 (50 x 1 mm, 5  $\mu$ m, 300 Å) Säule wurden lineare Acetonitrilgradienten mit einer Flussrate von 0,2 mL/min für die

---

Analyse der Proben verwendet. Der isokratischen Elution (2 % Eluent B, 2 min) folgte ein linearer Gradient von 2→100 % B über 10 min.

#### **3.4.12 Lagern und lyophilisieren von Proteinen und Proteinlösungen**

Proteinlösungen wurden mittelfristig bei - 20 °C und für eine langfristige Aufbewahrung bei - 80 °C gelagert. Synthetisierte Miniproteine wurden nach Faltung sowie finaler Reinigung lyophilisiert und bei RT gelagert.

Durch das Gefriertrocknen von Proteinlösungen konnten RP-HPLC Eluenten sowie H<sub>2</sub>O entfernt und Proteinlösungen einkonzentriert werden. Hierfür wurde der Operating Manual Freeze Dryer ALPHA 2-4 LSC mit einer Kondensationstemperatur von - 85 °C verwendet. Das benötigte Hochvakuum wurde mit Hilfe der Ilmvac Pumpe Typ 109012 erzeugt.

### **3.5 Biochemische Arbeitsmethoden**

#### **3.5.1 *Activ-site* Titration von Serinproteasen**

Die Methode der *active-site* Titration wurde verwendet, um die Konzentration aktiver Proteasemoleküle in Lösung zu ermitteln.<sup>211,212</sup> Hierfür wurde das Substrat 4-Methylumbelliferyl Guanidinbenzoat (MUGB) verwendet. Dem Prinzip einer Burst-Titration folgend wird das im Überschuss vorliegende Substrat schnell durch alle aktiven Proteasemoleküle umgesetzt. Das hierbei freigesetzte 4-Methylumbelliferon entspricht der Konzentration aktiver Zentren in Lösung. Das Guanidinbenzoat verbleibt hingegen im aktiven Zentrum der Protease und wird durch langsame Hydrolyse freigesetzt. Aufgrund der drastischen Signalzunahme zu Beginn und minimalen Fluoreszenzzunahme im weiteren Verlauf kann ein maximales Fluoreszenzsignal extrapoliert werden. Mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden des Fluorophors 4-Methylumbelliferon kann im Anschluss die Konzentration in Lösung vorliegender aktiver Proteasemoleküle berechnet werden.

Hierfür wurde eine Kalibrierungsgerade mit Blankwert und Endkonzentrationen des Fluorophors zwischen 20 und 400 nM in EK-Puffer in einer 96-well Mikrotiterplatte (schwarz, flach, Greiner BIO-ONE GmbH) angefertigt.

Des Weiteren wurden für eine Doppelbestimmung Proteaseverdünnungen in EK-Puffer mit Endkonzentrationen nach Substratzugabe (MUGB) von 200 und 250 nM sowie Blankwerten in der zuvor verwendeten Mikrotiterplatte erstellt. Den Proteasever-

dünnungen sowie entsprechenden Blankwerten wurden nun 20 µL einer 10 µM MUGB Lösung zugesetzt und eine Enzymkinetik über 30 min mit einminütigen Messintervallen dokumentiert. Das Gesamtvolumen der Probe je *well* betrug 200 µL. Für die Messung wurde der TECAN GENios™ Elisareader (Ex. 360 nm, Em. 465 nm) verwendet. Mit Hilfe der Geradengleichung der Kalibrierungsgeraden und dem aus der Enzymkinetik extrapolierten Fluoreszenzsignal konnte die Konzentration aktiver in Lösung vorliegender Protease berechnet werden.

### 3.5.2 Bestimmung der aktiven Inhibitorkonzentration hoch affiner Protease-inhibitoren

Ausgehend von einer 1:1 Interaktion hoch affiner Inhibitoren zu der entsprechenden Protease kann ein Korrekturfaktor ermittelt werden, durch den die Konzentration des aktiven in Lösung vorliegenden Inhibitors berechnet werden kann.<sup>175,213,214</sup> Hierfür wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und Verdünnungen der Inhibitoren in EK-Puffer mit Endkonzentrationen zwischen 0,05-2 µM in Gegenwart von 200 nM Trypsin oder Matriptase-1 für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Substrates Carbobenzoxy-L-arginine-7-amino-4-methylcoumarin mit einer Endkonzentration von 75 µM wurde eine Enzymkinetik über 5 min (Messintervall 15 s, Gain 55) aufgenommen. Der Versuch wurde in 96-*well* Mikrotiterplatten (schwarz, flach, Greiner BIO-ONE GmbH) mit einem Gesamtprobenvolumen von 200 µL je *well* durchgeführt. Für die Messung wurde der Tecan GENios™ Elisareader (Ex. 360 nm, Em. 465 nm) verwendet. Die normalisierte Reaktionsgeschwindigkeit wurde unter Verwendung von Sigmaplot 11 mit Hilfe der Morrison-Gleichung und variabler Enzymkonzentration ( $E_0$ ) sowie apparater Inhibitionskonstante ( $K_i^{app}$ ) gefittet.<sup>215</sup>

$$(5) \quad \frac{v}{v_0} = 1 - \frac{(E_0 + I_0 + K_i^{app}) - \sqrt{(E_0 + I_0 + K_i^{app})^2 - 4E_0I_0}}{2E_0}$$

Das Verhältnis der eingesetzten und zuvor ermittelten Proteasekonzentration ( $E_0$  real) zu der durch das Fitting ermittelten Enzymkonzentration ( $E_0$  Fit) ergibt einen Korrekturfaktor, mit dem die vorliegende Inhibitorkonzentration angepasst wird.

---

### 3.5.3 Bestimmung der Inhibitionskonstante hochaffiner Proteaseinhibitoren

Um die substratunabhängige Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) verschiedener Proteaseinhibitoren zu berechnen, musste zunächst die substratabhängige (apparente) Inhibitionskonstante ( $K_i^{\text{app}}$ ) ermittelt werden. Hierfür wurden Inhibitoren in EK-Puffer auf Endkonzentrationen von 0,1 nM-2  $\mu\text{M}$  verdünnt und in Anwesenheit von 1 nM Protease für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Hydrolyse des Substrates Boc-QAR-pNA (250  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 30 min bei 405 nm (Tecan Genios<sup>TM</sup> Elisareader) dokumentiert. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die  $K_i^{\text{app}}$  konnte dann durch Fitting der normalisierten Reaktionsgeschwindigkeiten (Formel 5, SigmaPlot 11) ermittelt werden.<sup>215</sup> Ausgehend von der Michaelis-Menten Konstante ( $K_m$ ) des Substrates für die entsprechende Protease und der  $K_i^{\text{app}}$  konnte die substratunabhängige Inhibitionskonstante unter Verwendung der Formel 6 berechnet werden.

$$(6) \quad K_i = \frac{K_i^{\text{app}}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)}$$

Der  $K_m$ -Wert des Substrates für Trypsin und Matriptase-1 wurden der Literatur entnommen.<sup>118</sup>

### 3.5.4 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Die Methode der Röntgenstrukturanalyse wurde für die Aufklärung ungelöster Proteinstrukturen verwendet. Hierbei wird der atomare Aufbau eines Kristalls anhand sich ergebender Beugungsmuster bestimmt, welche durch eine geeignete Strahlung erzeugt werden (Röntgen-, Neutronen-, Synchrotronstrahlung).

Für die Kristallisation des Miniproteins SOTI-III sowie einer Mutante im Komplex mit Trypsin wurde zunächst die Protease in 1 mM HCl (pH 2,0) und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  gelöst und mittels GFC (3.4.10.3) aufgereinigt. Hierfür wurde eine Superdex 75 16/60 Säule in 25 mM MES pH 5,5, 50 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 4 °C verwendet und ausgewählte Fraktionen anschließend auf 12 mg/mL konzentriert. Die Konzentration des Miniproteins wurde durch Zugabe des lyophilisierten Inhibitors auf 2,5 mM eingestellt und 30 min auf Eis inkubiert. Erste Kristallisationsversuche wurden unter Verwendung von Intelli-Plate<sup>TM</sup> 96-3 Platten mittels HoneyBee 961 *dispensing robot* durchgeführt. Für die Generierung von Kristallen mit hoher Diffraktionsqualität wurde nach Optimierung der

---

Kristallisationsbedingungen das *hanging-drop* Verfahren verwendet. Die Kristallisationsansätze wurden in 15-*well* Platten (EasyXtal) mit einem Pufferreservoir von 500 µL erstellt und für mehrere Tage bei 18 °C inkubiert. Die erhaltenen Kristalle wurden vor dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (> 0,8 x 0,1 mm) in 25 oder 33 % (w/v) Glycerol inkubiert, um Schäden durch das Einfrieren zu verringern.

Die Röntgendiffraktionsdaten wurden an der BESSY *synchrotron beamline* MX-14.1 aufgenommen. Die Daten wurden mit Hilfe der Software XDS/XSCALE indiziert, integriert und skaliert.<sup>216</sup> Die Phaseninformation der Kristalle wurde durch das Programm Phaser<sup>217</sup> unter Verwendung der Trypsin Koordinaten (PDB code: 2xtt) als Suchmodell erhalten. Die Aufarbeitung und Verfeinerung der Daten wurde mit Hilfe von Phenix.refine<sup>218</sup> durchgeführt und manuell mittels COOT<sup>219</sup> überprüft und verbessert. Abbildungen sowie Strukturalignments wurden mit Hilfe von PyMOL<sup>220</sup> angefertigt.

### **3.6 Zellbiologische Arbeitsmethoden**

#### **3.6.1 Immunofluoreszenzmarkierung von *S. cerevisiae***

Für den Nachweis zelloberflächenpräsentierter Proteine erfolgte eine Markierung mit spezifischen Antikörpern. Hierfür wurden  $1 \cdot 10^7$  induzierte Zellen (3.1.6) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 U/min, RT, TZ, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen mit 200 µL PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 20 µL Primärantikörperlösung (1:20 Verdünnung, Anti-cMyc oder Anti-HA Antikörper) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 200 µL PBS wurden die Zellen dann in 20 µL einer Biotin markierten Anti-Maus Antikörperlösung (1:20 Verdünnung) resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit 200 µL PBS konnten die Zellen in 20 µL einer SAPE-Lösung (1:20 verdünnt) aufgenommen werden und wurden nochmals für 10 min auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte ein finales Waschen der Zellen mit 200 µL PBS und das Resuspendieren des Zellpellets in 300 µL PBS. Bis zu einer Analyse mittels FACS oder FAC wurden die Proben im Dunkeln auf Eis gelagert.

#### **3.6.2 Markierung von *S. cerevisiae* mit biotinylierten Proteasen**

Für eine durchflusszytometrische Bindungsanalyse sowie Sortierung nach Proteasebindenden Hefezellen mittels FAC oder FACS wurden induzierte Hefezellen (3.1.6) mit biotinylierter Protease markiert. Dies erfolgte nachdem ein Nachweis der Oberflächen-

---

präsentation des Fusionsproteins (3.6.1) erbracht wurde. Im Fall einer Einfachmarkierung wurden  $1 \cdot 10^7$  Zellen pelletiert (13.000 U/min, RT, TZ, 5 min), mit 200  $\mu$ L PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in einer Proteaselösung der gewünschten Konzentration resuspendiert und für 15 min (analytische Messungen) oder 30 min (Sortierung) auf Eis inkubiert. Gefolgt von einem Waschen der Zellen mit 200  $\mu$ L PBS wurden die Zellen in 20  $\mu$ L SAPE-Lösung (1:20 Verdünnung) resuspendiert und 15 min auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem finalen Waschen mit 200  $\mu$ L PBS konnten die Zellen in 300  $\mu$ L PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss auf Eis gelagert werden. Für die Durchmusterung von Hefevariantenbibliotheken wurden in der ersten Sortierungsrunde  $2 \cdot 10^8$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ L markiert. Im Fall einer Doppelmarkierung wurden die Zellen in einer Proteaselösung der gewünschten Konzentration, die zusätzlich eine 1:20 Verdünnung des Anti-cMyc Antikörpers enthielt, gefärbt. Im darauf folgenden Färbeschritt wurden die Zellen in einer 1:20 Verdünnung SAPE und FITC-konjugiertem Anti-Maus Antikörper resuspendiert.

### **3.6.3 Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von *S. cerevisiae***

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde für Bindungsanalysen von auf Hefezellen präsentierten Fusionsproteinen genutzt. Die Selektion und Sortierung von Hefezellen, die das gewählte Zielprotein adressierten, erfolgte mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting* – FACS). Für durchflusszytometrische Analysen wurde das BD Accuri C6 *flow cytometer* (FAC, BD) oder das *MoFlo*-Zellsortiergerät (FACS, Beckman Coulter) verwendet. Hierfür wurde der Strahlengang des FACS mit Hilfe fluoreszierender *MicroBeads* eingestellt und fokussiert sowie Photomultiplier eingestellt (Parameter: *trigger side scatter* 650, FL1 600, FL2 600). Bei einer Frequenz zwischen 95.000 und 100.000 Tropfen pro Sekunde wurde die Anzahl zu analysierender Ereignisse auf maximal 30.000 pro Sekunde beschränkt. Im Fall von durchflusszytometrischen Bindungsstudien wurden 50.000 Ereignisse vermessen und die Daten mit Hilfe des Softwarepakets *Summit*® v4.3 ausgewertet.

Für fluoreszenzaktivierte Zellsortierung wurde das *MoFlo*-Zellsortiergerät genutzt. Hierfür wurden zusätzlich der Strahlengang sowie der Flüssigkeitsstrahl justiert. Des Weiteren musste der Tropfenabrisspunkt eingestellt sowie der *drop delay* des Geräts kalibriert werden. Primäre Sortierungen wurden im *sort-enrich3*-Modus und finale

---

Durchmusterungen in *sort-single1* Modus durchgeführt. Hefezellen, die im gewählten Selektionsfester vorlagen, wurden in ein 5 mL Falcon Röhrchen sortiert und für eine Bestimmung der Überlebensrate in serielle Verdünnungen auf SDCAA-Platten ausgestrichen. Während der Sortierung lag ein Probendruck zwischen 57 und 59 psi vor und die Ereignisfrequenz wurde auf maximal 30.000 pro Sekunde beschränkt.

### **3.7 Arbeiten in der Zellkultur**

#### **3.7.1 Kultivierung adhärent wachsender eukaryotischer Zelllinien**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich adhärent wachsende Zelllinien verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank Inkubator Typ B 5060 der Firma Heraeus. Ein Medienwechsel erfolgte nach spätestens drei Tagen oder starkem Farbumschlag (rot zu gelb) des im Medium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup> sowie 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen. Hierbei wurden 10 mL oder 25 mL vorgewärmtes Medium der Flaschengröße entsprechend eingesetzt. Ein Teilen oder Passagieren der Zellen wurde durchgeführt, wenn mehr als 90 % der Wachstumsfläche der Gewebekulturflaschen durch einen konfluenten Zellrasen bewachsen waren. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurde der Zellrasen mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung der Zellen wurde durch Zugabe von 10 mL vorgewärmten Medium abgestoppt und die entstandene Zellsuspension auf neue Kulturflaschen (1:6 Verdünnung) verteilt. Für die Kultivierung der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 wurde DMEM-Medium (10 % (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 % (v/v) Pen Strep) verwendet.

#### **3.7.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer**

Für eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen wie unter 3.7.1 beschrieben kultiviert, trypsiniert und für eine Lebendzellzahlbestimmung 1:1 mit einer Trypanblaulösung (4 % (w/v)) vermischt. Die Zellsuspension wurde anschließend auf die Zählkammer pipettiert und eine definierte Anzahl von Großquadraten ausgezählt. Mit Hilfe der im Folgenden aufgeführten Formel 7 konnte unter Vernachlässigung der blau gefärbten Zellen die Lebendzellzahl pro mL berechnet werden.

$$(7) \quad \text{Zellzahl/mL} = \frac{\text{Zellzahl} \cdot 2 (\text{Verdünnung})}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \cdot 10^4$$



---

### 3.7.3 Kryokonservierung und Revitalisierung humaner Zelllinien

Für eine dauerhafte Lagerung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden diese zunächst wie unter 3.7.1 beschrieben kultiviert und die Lebendzellzahl nach Trypsinierung der Kulturen (3.7.2) ermittelt. Im Anschluss wurden die Zellen sedimentiert (1.000 U/min, 10 min, Heraeus Megafuge 1.0), in FKS versetzt mit 10 % (v/v) DMSO aufgenommen und eine Zellzahl von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Im Anschluss wurden Aliquots mit  $3 \cdot 10^6$  Zellen erstellt und in einem mit Isopropanol gefüllten Eppendorfständer bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für eine anschließende Lagerung wurden die Kryogefrierkulturen nach 24 h in entsprechende Lagerungsbehältnisse überführt.

Für eine Rekultivierung der Kryogefrierkulturen wurden diese rasch im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut und direkt in eine  $25\text{ cm}^2$ -Gewebekulturflasche mit 10 mL vorgewärmtem Medium überführt. Nach 24 h erfolgt der erste Medienwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen und optimale Kulturbedingungen zu gewährleisten.

### 3.7.4 $\text{IC}_{50}$ Bestimmung von Matriptase-1 Inhibitoren *in vivo*

Für den Nachweis der Inhibition von Matriptase-1 auf der Oberfläche von humanen Krebszellen wurde eine Dosis-Wirkungs-Studie auf Krebszellen unter Kulturbedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die Zelllinien PC-3 wie unter 3.7.1 beschrieben kultiviert. Nach Abschaben der Zellen und Zellzahlbestimmung (3.7.2) wurden 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension ( $1 \cdot 10^5$  Zellen) je *well* einer sterilen 96-*well* Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zellen wurden zuvor in phenolrotfreiem DMEM-Medium mit 1 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) L-Glutamin sowie 1 % (v/v) Pen Strep aufgenommen und auf eine zehnfach höhere Zellzahl/mL als benötigt eingestellt. Von den zu analysierenden Matriptase-1 Inhibitoren wurden in dem zuvor beschriebenen Medium serielle 1:5 Verdünnungen (zweifach konzentriert) erstellt und den vorgelegten Zellen 100  $\mu\text{L}$  der Inhibitor-Lösungen zugesetzt. Kontrollen sowie Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-Konzentrationen wurden dann 10  $\mu\text{L}$  einer 5 mM uPa-Substratlösung (Endkonzentration 250  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt und eine Nullwertbestimmung bei 405 nm mit Hilfe des TECAN GENios™ Elisareader durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Mikrotiterplatte für 12 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Danach wurde die Dokumentation der 12 h Absorptionswerte, der Abzug der Absorptionswerte zum Zeitpunkt Null und eine Auftragung der daraus resultierenden Absorp-



---

tionswerte gegen die gewählten Inhibitorkonzentrationen vorgenommen. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe der Formel 8 angeglichen und die  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren auf der Zelloberfläche berechnet.

$$(8) \quad y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)} + y_{min}$$

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden Kapitel der Arbeit beschreiben die Isolierung und Charakterisierung neuer hochaffiner Inhibitoren der humanen Typ II transmembranen Serin Protease (TTSP) Matriptase-1. Ausgehend von den Trypsininhibitoren McoTI-II (*Momordica cochinchinensis*)<sup>172</sup> und SOTI-III (*Spinacia oleracea*)<sup>221</sup> wurde zunächst die funktionale Präsentation auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* überprüft (Kapitel 4.1). In Folge der Strukturaufklärung des Miniproteins SOTI-III (Kapitel 4.2) konnte ein strukturbasiertes Design der Miniproteinvariantenbibliotheken erfolgen und die Bibliotheken erstellt werden. Nach Charakterisierung und Validierung wurden die Bibliotheken auf Bindemoleküle der Proteasen Trypsin und Matriptase-1 durchmustert (Kapitel 4.2.5). Dann erfolgten Bindungsanalysen positiver Einzelklone, welche im Anschluss sequenziert wurden (Kapitel 4.4.3.2). In Folge einer Selektivitätsstudie des potentesten Matriptase-1 Inhibitors wurden Dosis-Wirkungs-Studien auf Matriptase-1 exprimierenden humanen Zelllinien durchgeführt, um eine Bioaktivität unter Zellkulturbedingungen zu belegen.

### 4.1 Grundlagenexperimente der Präsentation von SOTI-III auf *S. cerevisiae*

Die Präsentation der Cystin-Knoten EETI und AgRP auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* wurde bereits erfolgreich beschrieben.<sup>140,141,186</sup> Die funktionale Expression und Präsentation des Trypsininhibitors McoTI-II wurde in der Diplomarbeit von Niklas Weber untersucht und gezeigt. Da es sich bei SOTI-III, verglichen mit den zuvor genannten Trypsininhibitoren, um eine neue Klasse handelt, konnte nicht automatisch von einer funktionellen Präsentation ausgegangen werden. Daher wurde basierend auf diesen Arbeiten die Präsentation des Miniproteins SOTI-III auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* mittels *yeast surface display* untersucht.

#### 4.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pCT-SOTI-III-wt & pCT-SOTI-III-R32A

Für die Erstellung aller in dieser Arbeit generierten Expressionsvektoren auf Basis des pCT-Vektors wurde die Fähigkeit der Hefe zur homologen Rekombination (HR) genutzt. Durch diese Methode konnten außer einzelnen Trypsininhibitoren oder verschiedener Alaninmutanten auch Miniproteinvariantenbibliotheken in das pCT-Akzeptorplasmid integriert werden. Voraussetzung für diese Methode sind homologe DNA-Abschnitte auf dem Vektorfragment und dem zu integrierenden Gen. Die Erkennung dieser Bereiche

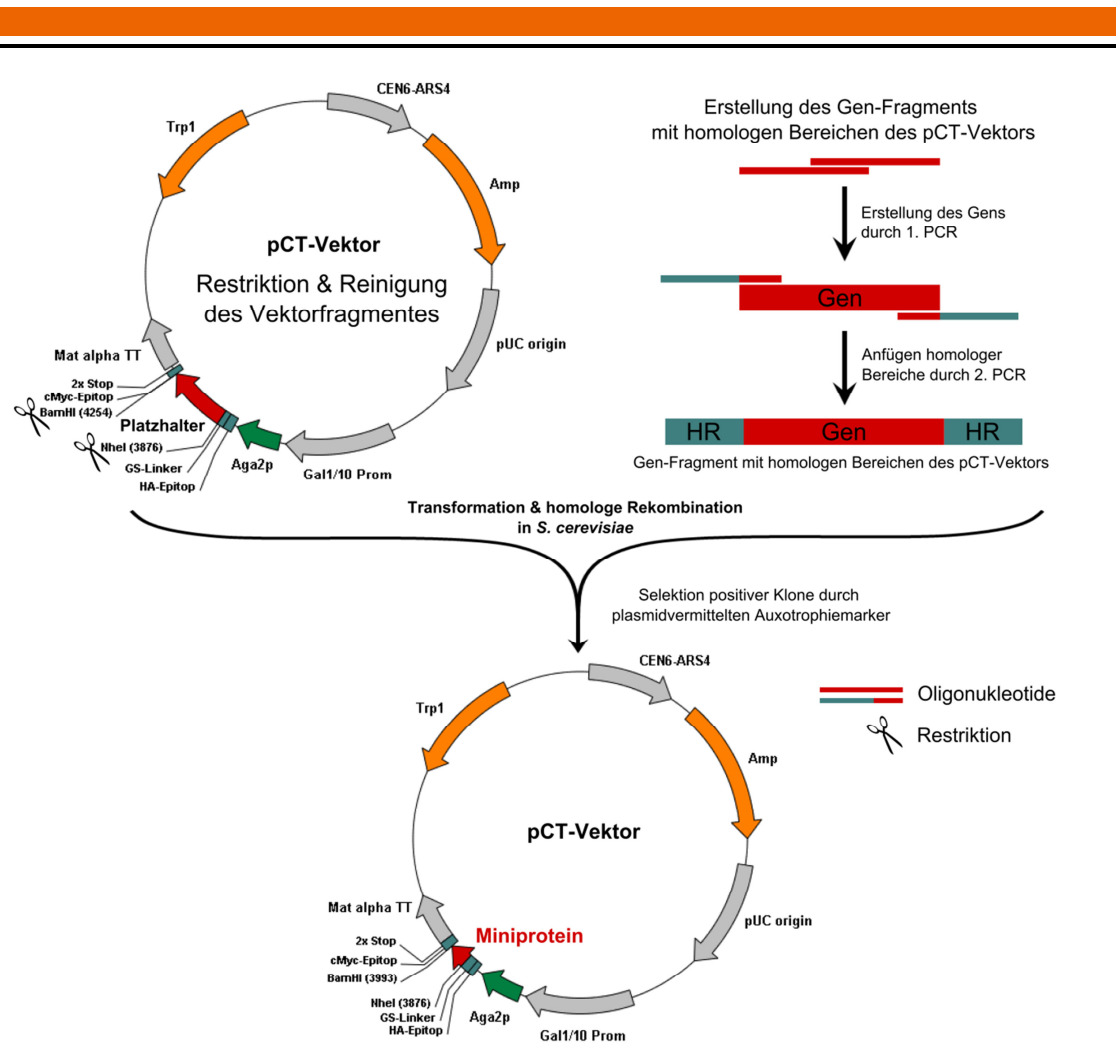


Abb. 4.1: Klonierungsschema von Miniproteinen und Miniproteinvariantenbibliotheken auf Basis des pCT-Vektors.

erfolgt durch die Familie der Rad-Proteine (Rad50p, Rad51p, Rad52p), wobei Rad51p eine zentrale Rolle in der Erkennung der 3'-Sequenz und der Rekrutierung weiterer für die homologe Rekombination notwendiger Proteine übernimmt.<sup>222</sup> Wie in Abb. 4.1 gezeigt, wird ein linearisiertes Vektorfragment zusammen mit dem zu integrierenden DNA-Abschnitt in *S. cerevisiae* transformiert. Beide weisen die gleichen homologen Bereiche auf. Durch anschließende Kultivierung erfolgt die Selektion auf den durch das funktional vorliegende Plasmid vermittelten Auxotrophiemarker.

Im Folgenden wird anhand der Erstellung des Vektors pCT-SOTI-III-wt die Klonierung von Miniproteinvarianten in den pCT-Vektor exemplarisch gezeigt. *E. coli* DH5α wurden hierfür mit dem Plasmid pCT-EGFR, welches durch die Arbeitsgruppe von Jennifer Cochran zu Verfügung gestellt wurde, transformiert (3.1.4) und in Ampicillin haltigem Medium kultiviert (3.1.3). Aus einer 50 mL Übernachtskultur wurde anschließend die

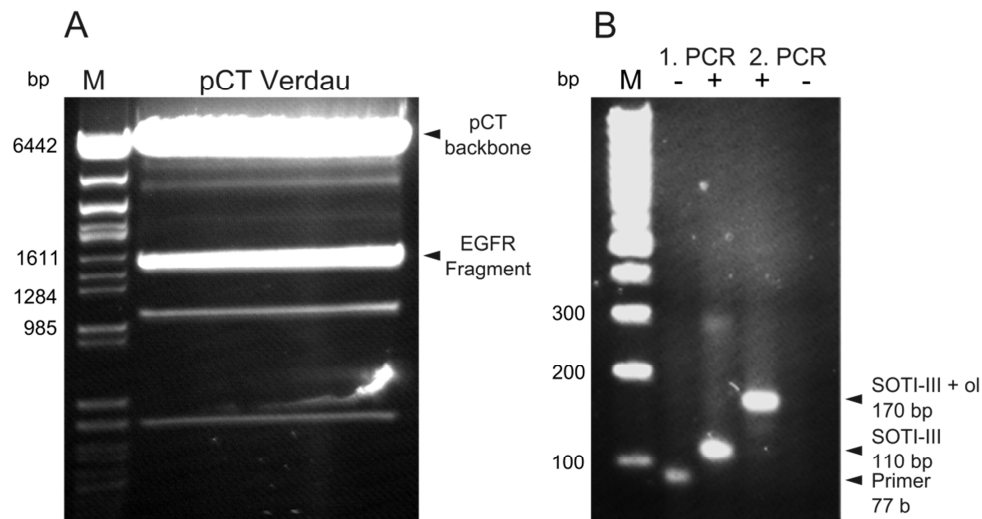


Abb. 4.3: Gelelektrophoresen der pCT-Restriktion und der PCR-Reaktionen des SOTI-III Fragmentes **A:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v) des gespaltenen pCT-EGFR Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BamHI*. M:  $\lambda$ -DNS/Eco 471 (AvaII) Marker **B:** HEC-Gelelektrophorese (1,5 % (w/v) Agarose, 1 % (w/v) Hydroxyethylcellulose) der SOTI-III PCR-Reaktionen. M: O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder.

Vektor-DNA isoliert (3.2.5.1). Nach Konzentrationsbestimmung (3.2.7) wurden 5,5  $\mu$ g des Plasmids im Volumen von 30  $\mu$ L mit den Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BamHI* für 24 h bei 37 °C verdaut (3.3.1). Nach Analyse der Spaltung mittels Gelelektrophorese (3.2.3, Abb. 4.3 A) erfolgte eine präparative Isolierung des Vektorfragmentes (3.2.4). Die DNA-Fragmente des Wildtyps wurde parallel in zwei PCR-Reaktionen (3.3.2) erstellt. Unter Verwendung der Primer SOTI-III\_wt\_up sowie SOTI-III-lo wurde in der ersten PCR das Gen synthetisiert und durch die Oligonukleotide SOTI-III-ol-up sowie SOTI-III-ol-lo in einer zweiten PCR homologe Bereiche angefügt (Tabelle 2.1). Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft (Abb. 4.3 B). Nach

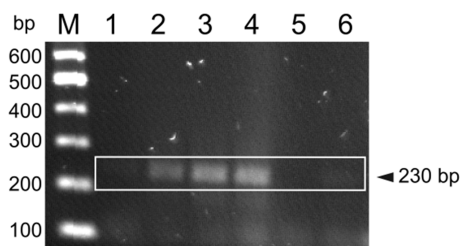


Abb. 4.2: Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) der Kolonie-PCR verschiedener Wildtyp-Einzelklone. M: O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder.

Integration des Wildtyps durch homologe Rekombination in Hefe (3.1.7), Kolonie-PCR (3.3.3, Abb. 4.2) und korrekter Sequenzierung wurde eine R29A-Mutante erstellt. Durch den Aminosäureaustausch sollte bestätigt werden, dass Arginin 29 in der C-terminalen Inhibitorschleife essentiell für die Bindung sowie Inhibition von Trypsin ist und den P<sub>1</sub>-Rest nach Schechter & Berger darstellt.<sup>93,221</sup> Da lediglich

Arginin 29 als basischer Rest in der Aminosäuresequenz vorliegt, ist davon auszugehen, dass dieser Rest sich in die S<sub>1</sub>-Bindungstasche der Protease einlagert (Abb. 4.5 A).

Das Gen mit flankierenden Bereichen für die Integration in den pCT-Vektor wurde durch eine PCR (3.3.2) erzeugt. Als Matrizen-DNA wurde der Vektor pCT-SOTI-III-*wt* verwendet und der Alaninaustausch durch die Primer pCT-lib-fwd und SOTI-*wt*-mod-R-A-lo erzeugt. Die PCR wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.3) überprüft, das Produkt aus der Gel-Matrix isoliert (3.2.4) und *S. cerevisiae* transformiert (3.1.7). Zur Untersuchung der Integration wurde eine Kolonie-PCR (3.3.3) durchgeführt, diese mittels Gelelektrophorese analysiert (3.2.3) und positiver Einzelklone sequenziert.

#### 4.1.2 Untersuchung der funktionellen Expression von SOTI-III *wt* und SOTI-III-R29A auf der Oberfläche von *S. cerevisiae*

Für die Analyse der funktionellen Expression und Präsentation der Miniproteinvarianten wurden sequenzierte Einzelklone der in Hefe vorliegenden Vektoren in 5 mL SDCAA-Medium kultiviert (3.1.5) und die Expression des Fusionsproteins induziert (3.1.6). Im Anschluss erfolgte ein Nachweis der Expression und Präsentation der Miniproteinvarianten durch Detektion des cMyc-Epitops (3.6.1). Für die Analyse der Bioaktivität des Inhibitors wurde anschließend die Bindung verschiedener biotinylierter Protease (Trypsin, Chymotrypsin, Matriptase-1) auf der Hefeoberfläche untersucht (3.6.2).

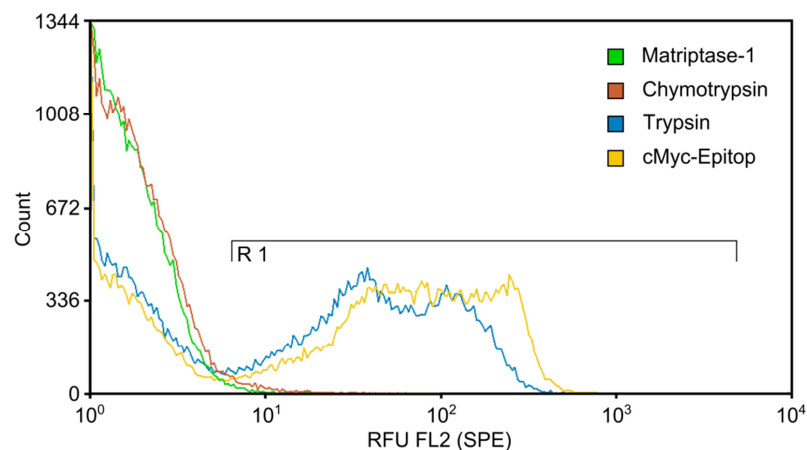


Abb. 4.4: Überlagerung der FACS-Histogramme einer Bindungsstudie des Miniproteins SOTI-III *wt* auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* EBY100 mit dem Expressionsvektor pCT-SOTI-III-*wt*. Das cMyc-Epitop wurde spezifisch durch Antikörper markiert. Für weitere Färbungen wurden Proteasen-Biotin-Konjugate in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt. x-Achse: relative Fluoreszenz; y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse. Insgesamt wurden  $5 \cdot 10^4$  Ereignisse analysiert. Modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>223</sup>

Wie in Abb. 4.4 dargestellt ist, konnte das Fusionsprotein bestehend aus Aga2p und SOTI-III *wt* durch eine spezifische Markierung des flankierenden cMyc-Epitops auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Die markierten Zellen sind im Bereich R1 der Abb. 4.4 zusehen und weisen eine stärkere relative Fluoreszenz als die nicht-markierten Hefezellen auf. Es wurde außerdem die Bindung des Inhibitors an Trypsin durch eine Markierung mit einem Biotin-Konjugat gezeigt. Eine Bindung der Proteasen Chymotrypsin und Matryptase-1 (4.4.1) ließ sich jedoch nicht nachweisen. Um zu bestätigen, dass R32 nach Kowalska *et al.*<sup>221</sup> essentiell für die Inhibition von Trypsin ist, wurde beide Varianten hinsichtlich ihrer Trypsinbindungseigenschaften untersucht (Abb. 4.5). Hierfür wurden die unter 4.1.1 erzeugten Einzelklone des Wildtyp und der R32A Mutante, deren Aminosäuresequenzen in Abb. 4.5 A zu sehen sind, kultiviert (3.1.5) und die Expression der Fusionsproteine induziert (3.1.6).

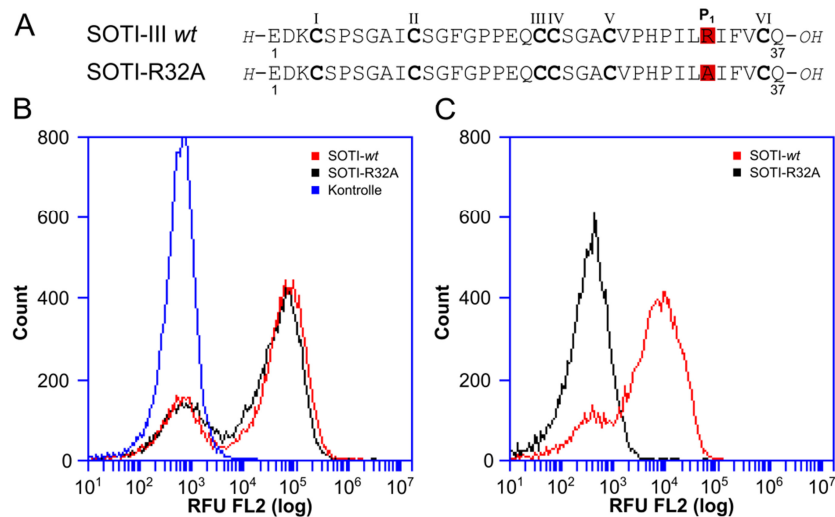


Abb. 4.5: Analyse der Bindung der Mini-proteine SOTI-III *wt* und einer Alaninmutante an Trypsin auf der Oberfläche von *S. cerevisiae*. **A:** Aminosäuresequenz der auf der Hefeoberfläche präsentierten Peptide SOTI-III *wt* sowie der Alaninmutante R32A. **B:** Überlagerung der FAC-Histogramme des Nachweis cMyc-Epitop Markierung. **C:** Überlagerung der FAC-Histogramme der Oberflächenmarkierung mit 500 nM biotinyliertem Trypsin. x-Achse: relative Fluoreszenz; y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse. Insgesamt wurden  $1,5 \cdot 10^4$  Ereignisse analysiert.

Durch Nachweis des cMyc-Epitops mittels Durchflusszytometrie (3.6.1, 3.6.3) konnte eine Präsentation des Fusionsproteins auf der Hefeoberfläche nachgewiesen werden (Abb. 4.5 B). Im Anschluss wurde die Bindung der SOTI-Varianten an Trypsin durch Markierung der Zellen mit 500 nM biotinylierter Protease analysiert. Wie in Abb. 4.5 C zu sehen, ist R32 essentiell für die Bindung der Protease, da die Alanin-Mutante keine Verschiebung der relativen Fluoreszenz aufweist und somit kein Trypsin gebunden hat.

---

### 4.1.3 Diskussion

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SOTI-III funktional auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert werden konnte. Hierfür wurden zunächst zwei Expressionsvektoren (Wildtyp und R32A) hergestellt (4.1.1). Anschließend wurden die beiden Varianten hinsichtlich der Präsentation auf *S. cerevisiae* und Proteasebindung untersucht.

Die Verankerung auf der Hefeoberfläche konnte indirekt durch das flankierende cMyc-Epitop gezeigt werden (Abb. 4.4). Weiterhin wurde durch Markierung mit biotinyliertem Trypsin die Funktionalität des Inhibitors zweifelsfrei nachgewiesen (Abb. 4.4). Demgegenüber war eine Bindung von Chymotrypsin und Matritase-1 auf der Hefeoberfläche nicht nachzuweisen.

Durch chemische Modifikation des einzigen in der C-terminalen Schleife des Inhibitors vorliegenden Arginins konnte ein vollständiger Aktivitätsverlust erzeugt werden.<sup>221</sup> Dies konnte bei Austausch des Arginin durch Alanin ebenfalls beobachtet werden. Hierfür wurde eine Alanin-Mutante des Wildtyp-Inhibitors auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert (Abb. 4.5 B) und die Bindung an Trypsin untersucht (Abb. 4.5 C). Im Gegensatz zum Wildtyp-Miniprotein konnte keine Verschiebung des Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden (Abb. 4.5 C). Diese Beobachtung legt nahe, dass die inhibitorisch aktive Schleife des Miniproteins im Bereich des C-Terminus vorliegt. Bei allen anderen bekannten Cystinknotenfamilien ist diese Schleife N-terminal lokalisiert. Aufgrund der einzigartigen Sequenz, der Position der Inhibitorschleife und der Verknüpfung der Disulfidbrücken wurde 2007 von Kowalska *et al.* postuliert, dass diese Miniproteine die neue Familie der *Mirabilis* Serinprotease-Inhibitoren darstellen.<sup>221</sup> Die zuvor dargestellten Ergebnisse bestätigen diese Hypothese in Bezug auf die Position der funktionalen Schleife des Inhibitors und zeigen, dass SOTI-III als Molekül für die Präsentation auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* geeignet ist.

## 4.2 Strukturaufklärung des Cystinknotens SOTI-III

Für die Erstellung kombinatorischer Bibliotheken mussten zunächst variable Aminosäurereste des Inhibitors SOTI-III für die Randomisierung ausgewählt werden. Da hierfür keine Struktur des Inhibitors vorlag, wurde die Kristallisation des Cystinknotens angestrebt. SOTI-III sowie eine Alaninmutante wurden hierfür chemisch synthetisiert und in Komplex mit Trypsin kristallisiert.

### 4.2.1 SPPS und Faltung von SOTI-III *wt* sowie der Alaninmutante F14A

Die Synthese, oxidative Faltung und Reinigung der in dieser Arbeit analysierten synthetischen Cystinknoten wurde von Dipl.-Ing. Michael Reinwarth durchgeführt. Die Synthese der linearen Vorstufen der Cystinknoten SOTI-III *wt* und SOTI-III F14A erfolgte

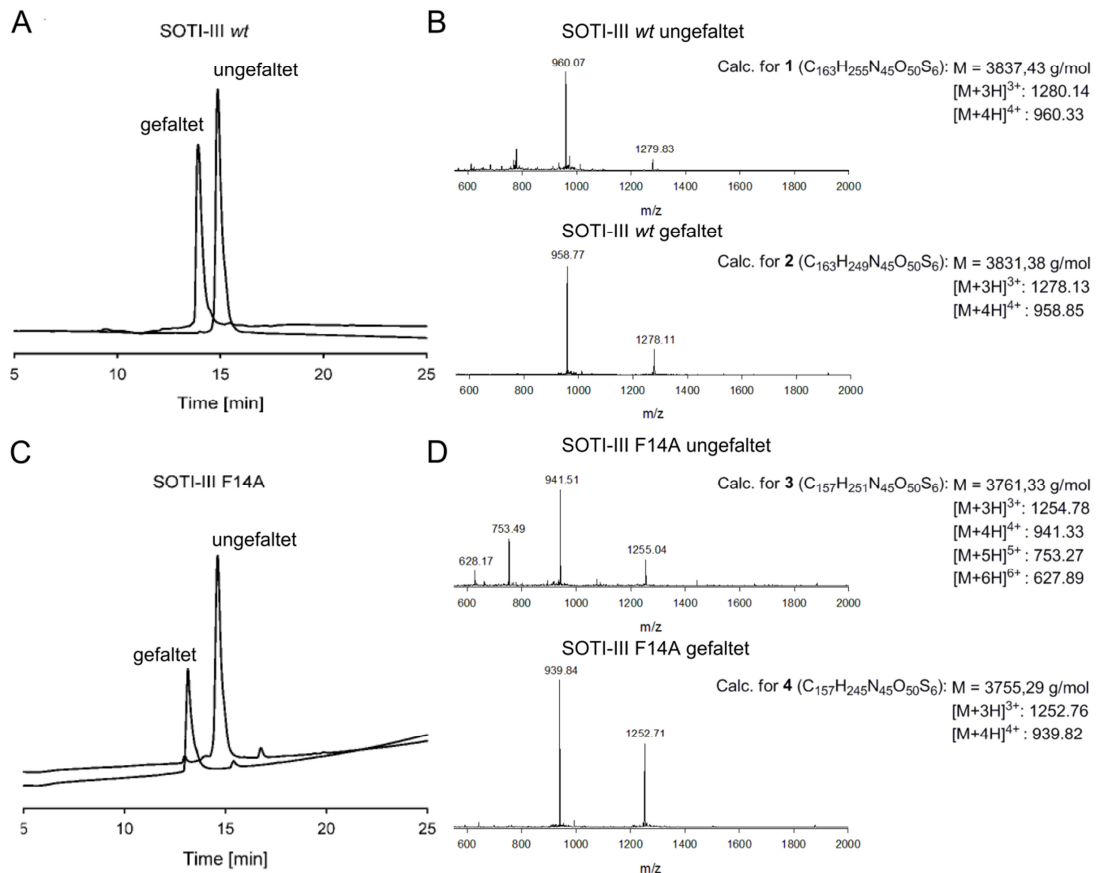


Abb. 4.6: Synthese und oxidative Faltung der Miniproteine SOTI-III *wt* und SOTI-III F14A. **A:** HPLC-Verlauf der linearen Vorstufe sowie des gefalteten Peptids SOTI-III *wt* bei 220 nm. **B:** Massenspektrometrische Analyse (LC-MS) der in A aufgereinigten Miniproteine. **C:** HPLC-Verlauf der linearen Vorstufe sowie des gefalteten Peptids SOTI-III F14A bei 220 nm. **D:** Massenspektrometrische Analyse (LC-MS) der in C aufgereinigten Miniproteine. Modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>224</sup>



durch mikrowellengestützte Peptidfestphasensynthese (SPPS, 3.4.8). Die Reinheit der Peptide wurde durch HPLC (3.4.10.4) sowie LC-ESI-MS (3.4.11) überprüft (Abb. 4.6). Im Anschluss wurde die oxidative Faltung der linearen Vorstufen im wässrigen Puffersystem (3.4.9)<sup>181</sup> vorgenommen und durch analytische HPLC (3.4.10.4) und LC-MS (3.4.11) überwacht (Abb. 4.6). Nach einem finalen Reinigungsschritt ergaben sich Ausbeuten von 23,8 % und 16,2 % für SOTI-III *wt* beziehungsweise der F14A Mutante bezogen auf die linearen Peptidvorstufen.<sup>224</sup>

#### 4.2.2 Kristallisation und Strukturaufklärung des Miniproteins SOTI-III

Für die Strukturaufklärung der Miniproteine wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schmelz (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) initiale Kristallisationsstudien wie unter 3.5.4 beschrieben durchgeführt. Die Kristallisation der Knottine erfolgte im Komplex mit Trypsin isoliert aus Rinderpankreas. Hierfür wurden Proteinlösungen mit 12 mg/mL Trypsin und 2,5 mM SOTI-III *wt* im Verhältnis 1:5 in 25 mM MES pH 5,5, 50 mM NaCl und 10 mM CaCl<sub>2</sub> erstellt. Nach Inkubation der Probe für 30 min bei 4 °C wurde die Proteinlösung in gleichen Anteilen mit Präzipitationslösung (0,1 M Imidazol pH 8,0, 10 % (w/v) PEG 8000) gemischt und für ein bis zwei Tage bei 4 °C inkubiert, worauf sich erste nadelförmige Proteinkristalle abzeichneten (Abb. 4.7). Im Fall der Alaninmutante wurden 11,5 mg/mL Trypsin und 1,5 mM SOTI-III F14A für das Erstellen der Proteinlösung eingesetzt. Basierend darauf wurden Optimierungen der

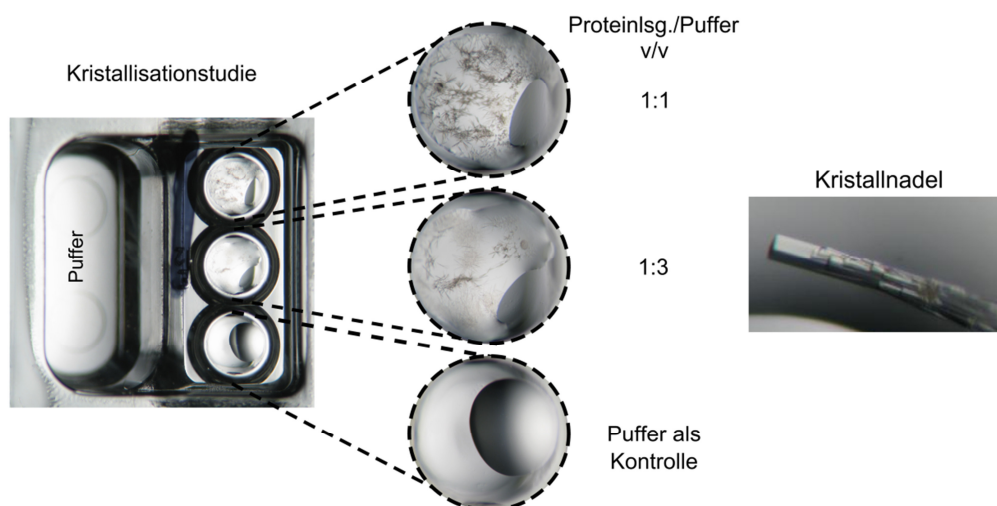


Abb. 4.7: Primäre Kristallisationsversuche des Miniproteins SOTI-III *wt* im Komplex mit Trypsin. Links ist der Ausschnitt einer 96-well Kristallisationsplatte mit einer Pufferbedingung gezeigt. In der Mitte ist eine Vergrößerung der Studie mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und Puffer als Kontrolle dargestellt. Rechts ist eine Detailansicht einer Kristallnadel illustriert.

Pufferbedingungen vorgenommen, um die Kristallisation zu verbessern. Für die Erzeugung von Kristallen mit hoher Streuungsqualität wurden für die Miniproteine SOTI-III wt und SOTI-III F14A die Präzipitationsbedingungen 0,1 M Imidazole pH 7,5, 12 % (w/v) PEG 8000 bzw. 0,1 M Bicine pH 9, 20 % (w/v) PEG 6000 ermittelt.<sup>224</sup> Das Sammeln und Auswerten der Diffraktionsdaten wurde von Dr. Stefan Schmelz durchgeführt und erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben.

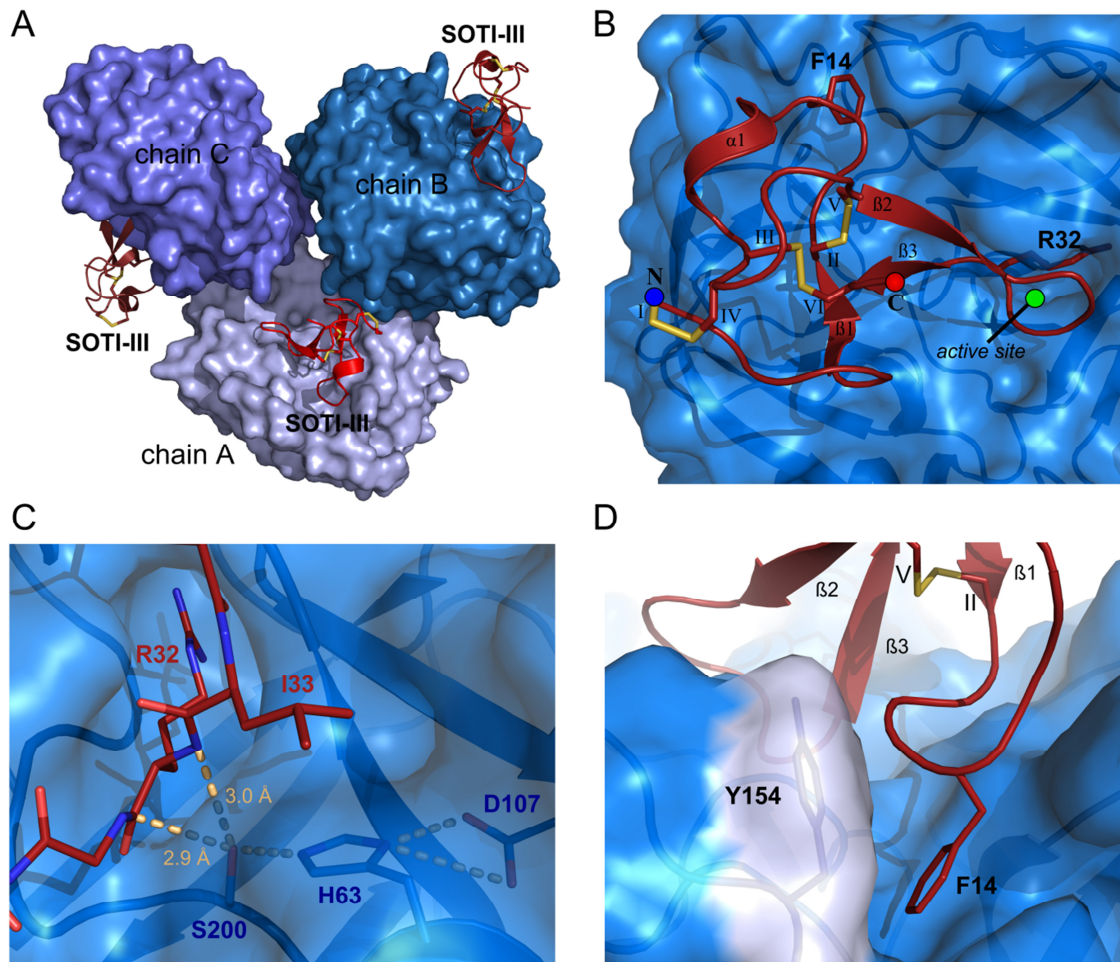


Abb. 4.8: Struktur des Miniproteins SOTI-III im Komplex mit Rinderpankreas Trypsin. **A:** Asymmetrische Einheit mit drei Proteinkomplexen bestehend aus Trypsin (Darstellung der Oberflächen) und SOTI-III (Cartoon). **B:** Bindungstasche von Trypsin mit SOTI-III. Cystein-Reste sind mit römischen Nummern entsprechend ihrer Position in der Aminosäuresequenz markiert. Disulfidbrücken sind in gelb illustriert. **C:** Detailansicht der Inhibitorschleife des Inhibitors SOTI-III (rot) in der Bindungstasche von Trypsin mit dargestellter katalytischer Triade (blau). R32 ist in der S<sub>1</sub>-Tasche substratähnlich ausgerichtet.<sup>93</sup> Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. Die kürzesten Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend von S200 sind in orange illustriert. **D:** Detailansicht einer durch F14 des Miniproteins adressierten Trypsin-Bindungstasche. Y154 der Protease (schwarz) ist von F14 weg orientiert. Abbildungen wurden mit Hilfe der Kristallstruktur von SOTI-III im Komplex mit Trypsin erstellt (PDB: 4aor).<sup>224</sup>

Die Kristalle der Miniproteine im Komplex mit Trypsin (Abb. 4.8) wiesen eine  $P2_1$  Symmetrie auf und streuten mit einer Auflösung von 1,7 Å für SOTI-III wt bzw. 2,0 Å im Fall der F14A Mutante.<sup>221,224</sup> Die Sekundärstruktur der Miniproteine weist die zuvor postulierte Disulfidbrückenverknüpfung Cys4–Cys21 (CysI–CysIV), Cys11–Cys25 (CysII–CysV) und Cys20–Cys36 (CysIII–CysVI) auf (Abb. 4.8 B und Abb. 4.9).<sup>221</sup>

Das Grundgerüst des Inhibitors wird durch die Pseudoknotenstruktur und drei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter ausgebildet. Des Weiteren liegt zwischen den Resten 16-19 eine kurze  $\alpha$ -Helix mit einer Länge von vier Aminosäuren vor (Abb. 4.9). Die Inhibitorschleife (Reste 26-34) weist einen  $\beta$ -hairpin mit einem  $\gamma$ -turn auf (Abb. 4.9) und beinhaltet den in die  $S_1$ -Bindungstasche der Protease eingelagerten  $P_1$ -Rest Arginin 32 (Abb. 4.8. B & C).<sup>224</sup>

Der Inhibitor SOTI-III ist in allen Protease-Inhibitor-Komplexen zu den katalytisch aktiven Resten (H63, D107 und S200) ausgerichtet und weist nur eine geringe mittlere quadratische Abweichung (RMSD) von  $0,227 \pm 0,026$  Å auf, die denen der Proteasemoleküle entsprechen. Die flexibelsten Bereiche liegen in Bereichen des Inhibitors (Schleife 1 & 3 sowie der  $\alpha$ -Helix), die von der Bindungstasche weg orientiert sind.<sup>224</sup> Fünfzehn Reste des Inhibitors sind mit einer Bindungsfläche von ca. 750 Å<sup>2</sup> an der Interaktion mit 24 Resten der Protease (ca. 980 Å<sup>2</sup> Interaktionsfläche) beteiligt.

Insgesamt sind zwölf Wasserstoffbrückenbindungen für die Koordination des Inhibitors im aktiven Zentrum der Protease verantwortlich. Hiervon gehen alleine acht vom  $P_1$ -Rest (R32) des Inhibitors aus.<sup>224</sup> Des Weiteren wird eine separate Bindungstasche der Protease, ausgebildet von I78, W144 und P155, durch F14 des Knottins SOTI-III adressiert (Abb. 4.8 D).

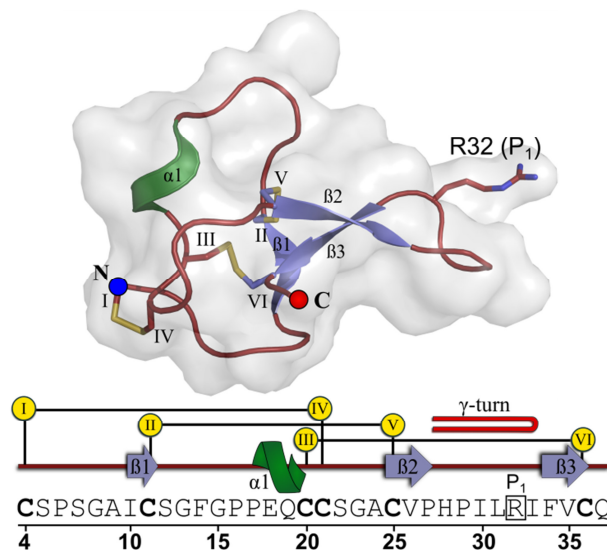


Abb. 4.9: Sekundärstruktur und Topologie des Trypsininhibitors SOTI-III. Hellblaue Pfeile zeigen  $\beta$ -Faltblätter. Die kurze Helix  $\alpha 1$  ist in grün dargestellt. Disulfidbrücken sind als schwarze Linien oder gelbe Stäbe illustriert. Cystein-Reste sind mit I-VI markiert. Die rote U-förmige Linie stellt den  $\beta$ -hairpin mit einem  $\gamma$ -turn in der C-terminalen Inhibitorschleife dar.

Eine detaillierte Datenbankanalyse zeigte, dass kein anderer Trypsininhibitor diesen Bereich der Protease anspricht (Abb. 4.11).<sup>224</sup> Durch Kristallisation der SOTI-III F14A Mutante des Inhibitors im Komplex mit Trypsin konnte dies zusätzlich belegt werden (PDB: 4aoq).<sup>224</sup> Der zuvor durch F14 ausgefüllte Bereich wurde im Fall der Kette C des Co-Kristalls der Mutante durch Y154 belegt. Dies weist darauf hin, dass die Seitenkette zwischen diesen Rotamerzuständen wechseln und damit die Bindung sowie Bioaktivität beeinflussen kann.

#### 4.2.3 Biochemische Charakterisierung der Inhibitorvarianten

Der Einfluss des F14 auf die Bioaktivität des Inhibitors wurde durch Bestimmung der substratunabhängigen Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) des Wildtyp und der F14A Mutante analysiert. Hierfür wurde zunächst der Anteil aktiver in Lösung vorliegender Protease- (3.5.1) und Inhibitormoleküle ermittelt (3.5.2). Anschließend wurden Inhibitionsmessungen für die Bestimmung der substratabhängigen Inhibitionskonstante ( $K_i^{app}$ ) wie unter 3.5.3 durchgeführt und die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Protease in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen ermittelt (Abb. 4.10).

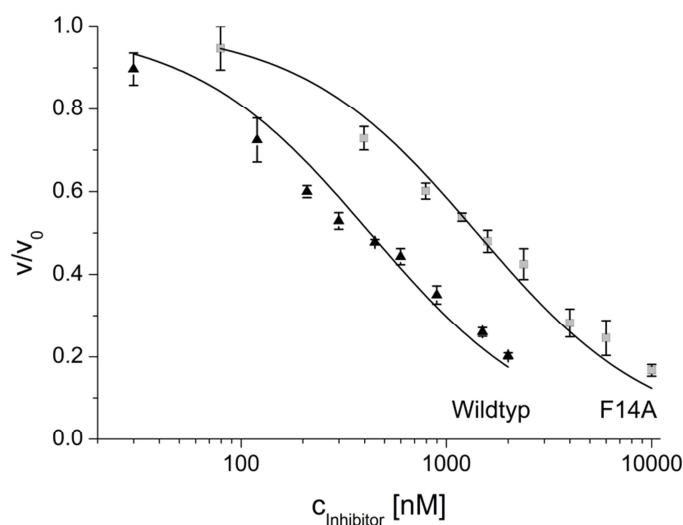


Abb. 4.10: Inhibitionsmessungen der F14A Mutante (graue Vierecke) und des SOTI-III *wt* (schwarze Dreiecke) gegen Rinderpankreas-Trypsin. Die Fehlerbalken wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>224</sup>

Durch das Fitten der Daten mit Hilfe der Formel 5 (3.5.3) konnte die  $K_i^{app}$  bestimmt und die  $K_i$  der Trypsininhibitoren mit Hilfe der  $K_m$  der Protease für das verwendete Substrat berechnet werden. Für SOTI-III *wt* und SOTI-III F14A ergaben sich Inhibitions-konstanten von  $61 \pm 8 \text{ nM}$  beziehungsweise  $202 \pm 28 \text{ nM}$ .



#### 4.2.4 Vergleich und Klassifizierung des Trypsininhibitors SOTI-III

Für die weitere Klassifizierung des Inhibitors wurde das Miniprotein mit bekannten und bereits strukturell analysierten Co-Kristallstrukturen bestehend aus Inhibitor und Trypsin verglichen (Abb. 4.11, 6).

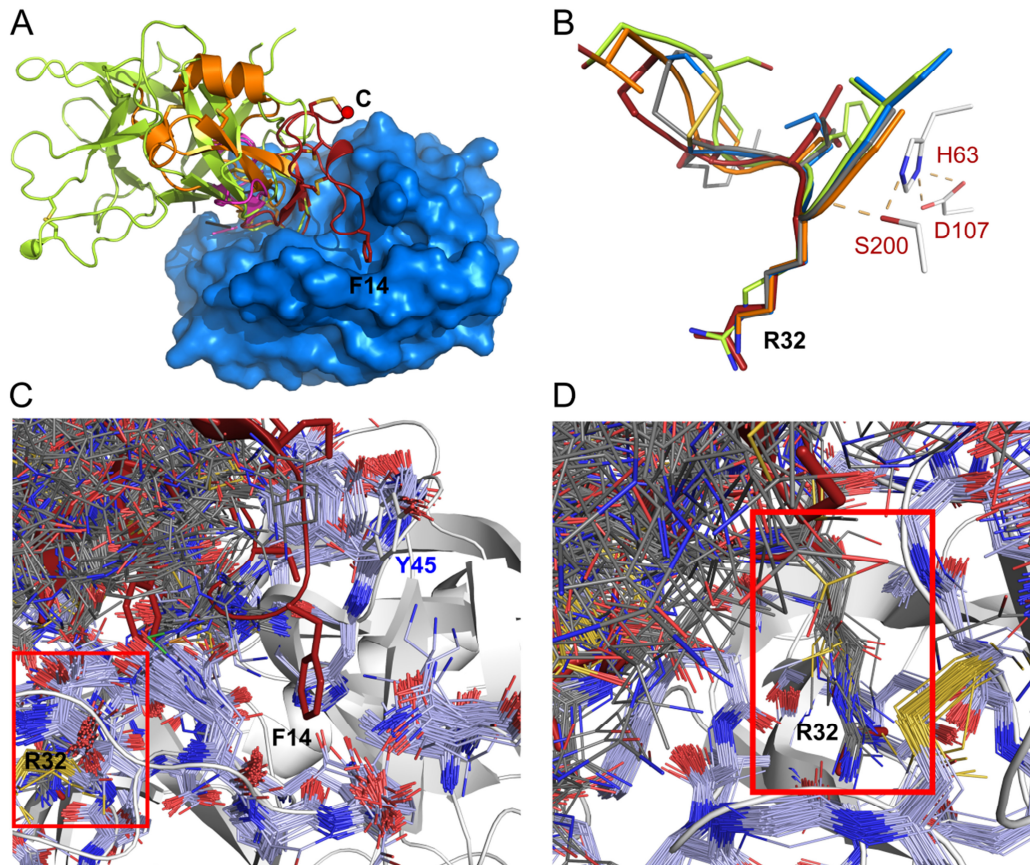


Abb. 4.11: Vergleich der Ausrichtung von SOTI-III mit anderen peptidischen Trypsininhibitoren. **A:** Überlagerung anderer kanonischer Inhibitoren mit SOTI-III. Die Oberfläche von Trypsin ist in blau illustriert. SOTI-III ist in rot (PDB: 4aor)<sup>224</sup>, STI in hellgrün (PDB: 1avw)<sup>225</sup>, SFTI-I in dunkelgrau (PDB: 1sfi)<sup>226</sup>, CPTI-II in pink (PDB: 2btc)<sup>227</sup> und BPTI in orange (PDB: 1f7z)<sup>228</sup> dargestellt. Für die Darstellung wurden die Hauptketten der Trypsin-Moleküle überlagert. **B:** Detailansicht der in das aktive Zentrum ragenden Reste und der Inhibitorschleife mit Arginin oder Lysin als P<sub>1</sub>-Rest. CPTI-II ist in blau dargestellt. Die farbliche Darstellung der Inhibitoren entspricht ansonsten der in A. Reste des aktiven Zentrums sind als Stab dargestellt und C, N und O-Atome in weiß, dunkelblau beziehungsweise rot illustriert. **C:** Überlagerung der SOTI-III Co-Kristallstruktur mit 99 Trypsininhibitor-Strukturen, die sich in der Nähe der Reste 12-15 des Miniproteins SOTI-III befinden (6). Trypsin ist in weiß beziehungsweise SOTI-III in rot dargestellt. Die vorliegenden Proteasemoleküle überlagern sich gut, während dies nicht für die gezeigten Inhibitoren (grau) zutrifft und F14 eine weitere Bindungstasche der Protease adressiert. Des Weiteren weist Y45 des SOTI-III Komplexes eine andere Rotamerkonformation als in den vorliegenden Strukturen auf. **D:** Detailansicht des Bereichs der Inhibitorschleife in C, der den P<sub>1</sub>-Rest (R32, roter Rahmen) der überlagerten Inhibitorstrukturen zeigt. Abbildungen wurden mit Hilfe der Kristallstruktur von SOTI-III im Komplex mit Trypsin (PDB: 4aor) erstellt.<sup>224</sup>

---

Die Komplexe wurden anhand der Proteasemoleküle überlagert und zeigen, dass sich SOTI-III in die gleiche Bindungstasche der Protease einlagert (Abb. 4.11 B & D). Zusätzlich interagiert F14 des Inhibitors mit einer bis dahin nicht adressierten Tasche der Protease (Abb. 4.11 A & C). Die im Komplex vorliegende Struktur der inhibitorisch aktiven C-terminalen Schleife des Cystinknoten weist eine konvexe Form auf und ragt in die Bindungstasche der Protease, ohne Veränderungen in der Konformation der Protease zu verursachen.<sup>224</sup> Zusätzlich ist der P<sub>1</sub>-Rest des Inhibitors essentiell für die Komplexbildung, da allein acht von zwölf Wasserstoffbrückenbindungen von R32 ausgebildet werden und einen erheblichen Einfluss auf die Assoziationsenergie haben.<sup>224</sup> Im Vergleich mit anderen kanonischen SPIs wie z. B. STI, SFTI-I, CPTI-II und BPTI zeigt SOTI-III keine Abweichung in der Konformation der Inhibitorschleife zu der eines kanonischen SPIs (Abb. 4.11. B).

#### 4.2.5 Diskussion

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Strukturaufklärung des Trypsininhibitors SOTI-III. Das lineare Miniprotein konnte hierfür erfolgreich im präparativen Maßstab durch mikrowellengestützte Festphasensynthese erzeugt werden (4.2.1.). Nach Oxidation des linearen Peptids konnte das gefaltete Protein mittels HPLC aufgereinigt und der oxidierte Zustand durch massenspektrometrische Analysen nachgewiesen werden (Abb. 4.6).

Im Folgenden konnte das Miniprotein im Komplex mit Rinderpankreas-Trypsin kristallisiert werden. Die analysierten Kristalle wiesen eine P<sub>2</sub><sub>1</sub> Symmetrie auf und streuten bis zu einer Auflösung von 1,7 Å. Die asymmetrische Einheit setzt sich aus drei Protease-Inhibitor-Komplexen zusammen, wobei das aktive Zentrum in allen Komplexen durch den Cystinknoten blockiert wird. Die zuvor durch Kowalska *et al.* mittels proteolytischem Verdau ermittelte Disulfidbrückenverknüpfung (CysI-CysIV, CysII-CysV, CysIII-CysVI) konnte durch die im Kristall vorliegende bestätigt werden.<sup>221</sup> Außerdem wurde durch chemische Modifikation der Guanidyl-Gruppen der Aminosäure Arginin mittels 1,2-Cyclohexanedion (CHD) ein kompletter Aktivitätsverlust des Inhibitors verursacht. Da an Position 32 in der C-terminalen Schleife des Inhibitors das einzige in der Sequenz vorhandene Arginin vorliegt und dementsprechend diese Aminosäure modifiziert wurde, postulierte Kowalska *et al.* diese Aminosäure als den in das aktive Zentrum (S<sub>1</sub>-Tasche) eingelagerten P<sub>1</sub>-Rest des Inhibitors.<sup>221</sup> Diese Beobachtungen konnten nun durch die vorliegende Kristallstruktur des Inhibitors im Komplex mit

---

Trypsin bestätigt werden. Das einzige in der Aminosäuresequenz vorliegende Arginin an Position 32 des Miniproteins SOTI-III lagert sich als P<sub>1</sub>-Rest in der S<sub>1</sub>-Bindungstasche der Protease ein (Abb. 4.8. B & C) und ist somit essentiell für Bindung und Inhibition der Protease.<sup>93,224</sup>

Des Weiteren geht aus der nun vorliegenden Struktur des Cystinknotens SOTI-III im Komplex mit Trypsin hervor, dass durch ein Phenylalanin an Position 14 des Inhibitors eine weitere Bindungstasche der Protease adressiert wird. Um dies zu bestätigen, wurde eine F14A-Mutante des Inhibitors synthetisiert und wie zuvor oxidativ gefaltet, aufgereinigt und charakterisiert (4.2.1, Abb. 4.6). Nach Kristallisation der Miniprotein-Mutante in Komplex mit Trypsin (PDB: 4aoq)<sup>224</sup> zeigte sich jedoch, dass die zuvor ausgebildete Bindungstasche zum Teil nicht mehr vorlag. Dies konnte auf eine Verlagerung der Aminosäure Y154 in einen anderen Rotamerzustand zurückgeführt werden.<sup>224</sup> Außerdem konnte nach Vergleich der Wildtyp Struktur mit 99 weiteren Trypsininhibitoren festgestellt werden, dass ausschließlich eine Interaktion von SOTI-III mit der benachbarten Bindungstasche der Protease ausgeht (4.2.4, Abb. 4.11 A & B). Zusätzlich konnte durch Enzymkinetiken der SOTI-III Varianten mit Trypsin ein Einfluss dieser Interaktion auf die Bindung und Inhibition der Protease durch F14 des Miniproteins nachgewiesen werden (4.2.3, Abb. 4.10). Die K<sub>i</sub> (Wildtyp-Inhibitor 61 nM) verschlechterte sich durch Austausch des Phenylalanins gegen Alanin auf 202 nM.<sup>224</sup> Dies zeigt, dass F14 einen Beitrag zur Bindung des Inhibitors an die Protease leistet und SOTI-III sich dadurch von anderen Trypsininhibitoren abgrenzt.

Serinproteaseinhibitoren (SPI) können basierend auf der Art und Weise der Inhibition in kanonische Inhibitoren, nichtkanonische Inhibitoren oder Serpine klassifiziert werden.<sup>23,83</sup> Im Fall der Serpine wird ein irreversibler Protease-Inhibitor-Komplex ausgebildet, was mit großen konformationellen Änderungen des Enzyms und dem Zerreißen des aktiven Zentrums einhergeht.<sup>85,86</sup> Nicht-kanonische Inhibitoren wie z. B. Hirudin adressieren die Protease durch zwei N-terminale Interaktionsregionen in einer Zweischritt-Kinetik.<sup>89,229</sup> Im Gegensatz zu diesen SPI-Gruppen binden kanonische SPIs (3-21 kDa pro Domäne) durch eine einzige konvexe Schleife im aktiven Zentrum der Protease ohne konformationelle Änderungen zu verursachen.<sup>91</sup> Außerdem ist der P<sub>1</sub>-Rest des Inhibitors essentiell für die Bindung und Inhibition der Serinprotease sowie die Assoziationsenergie.<sup>92</sup> Wie unter 4.2.2 und 4.2.4 dargestellt, weist SOTI-III mit der Disulfidbrückenverknüpfung und Pseudoknotenstruktur die strukturellen Merkmale

---

von Cystinknoten auf. Des Weiteren erfüllt SOTI-III alle zuvor beschriebenen Eigenschaften eines kanonischen SPIs und wurde aufgrund dessen zusammen mit den *Mirabilis jalapa* Trypsininhibitoren als eine neue Familie der kanonischen Serinproteaseinhibitoren eingestuft.<sup>224</sup> Zuvor wurden diese Miniproteine aufgrund ihrer einzigartigen Aminosäuresequenz, der am C-Terminus lokalisierten Inhibitorschleife und der Pseudoknotenstruktur zusätzlich als neue SPI-Familie und Cystinknoten-Familie eingeordnet.<sup>221</sup>



## 4.3 Erzeugung und Charakterisierung von Miniproteinvariantenbibliotheken auf Basis von MCoTI-II und SOTI-III

### 4.3.1 Strukturbasiertes Design der Miniproteinbibliotheken auf Basis von SOTI-III und MCoTI-II

Basierend auf der NMR-Struktur von MCoTI-II und der Kristall-Struktur von SOTI-III konnten nun die zu variierenden Aminosäurereste für das Bibliotheken-Design ausgewählt werden. Dabei wurden folgende Anforderungen zugrunde gelegt. Die Reste sollten tolerant gegenüber Aminosäureaustauschen sein, ohne die Faltung und Stabilität der Inhibitoren negativ zu beeinflussen. Außerdem sollten die Reste eine möglichst große Interaktionsfläche zu Zielproteinen ermöglichen.

#### 4.3.1.1 Design der SOTI-III-Bibliothek

Die Auswahl der zu variierenden Aminosäurereste im Fall der SOTI-III-Bibliothek erfolgte basierend auf der durch Glotzbach *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur des Miniproteins SOTI-III (PDB: 4qar).<sup>224</sup> Die Modifikation beschränkte sich hierbei auf die C-terminale kanonische Schleife des Inhibitors zwischen CysV und CysVI. Der N-terminale und mittlere relativ kompakte Bereich des Knottins wurde nicht variiert, da dies die Faltung und Stabilität des Inhibitors negativ beeinflussen könnte. Des Weiteren lagen bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten über den Einfluss von Modifikationen des Grundgerüsts auf die Faltung und Stabilität des Knottins vor. Da sich jedoch die Inhibitor-

schleife des Miniproteins aus zehn Aminosäureresten zusammensetzt und aus der Struktur heraus ragt (Abb. 4.12), sollte der variierte Bereich des Peptids ausreichen, um eine möglichst große von dem Molekül weisende Interaktionsfläche auszubilden (Abb. 4.12).

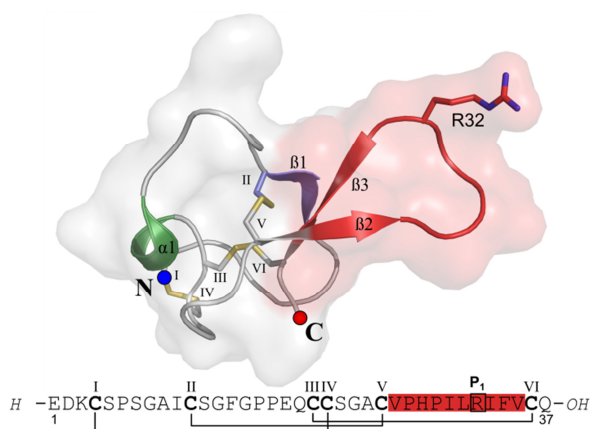


Abb. 4.12: Design der SOTI-III Variantenbibliothek. Variierte Bereiche des Inhibitors sind im Cartoon (PDB: 4qar)<sup>224</sup> und der Sequenz des Wildtyp-Moleküls in Rot (100 % randomisiert) illustriert. Cystein-Reste sind fett sowie nummeriert und Disulfidbrücken in Gelb oder schwarzen Linien dargestellt.

Für die Modifikation der Aminosäurereste, die den P<sub>1</sub>-Rest des Inhibitors (R32) einschließt, wurde eine NNK Randomisierung der Codone gewählt. Hierbei steht N für jede

---

organische Base und K für Guanin oder Thymin. Es werden somit 32 der 64 in der Natur vorkommenden Codone realisiert, die aber für alle 20 natürlichen Aminosäuren kodieren. Bestandteil der NNK Randomisierung ist auch das Triplet TAG (*amber* Stop) und TGT (Cystein).<sup>230</sup> Eine definierte Disulfidbrückenverknüpfung ist für die Bioaktivität der Inhibitoren essentiell. Aufgrund dessen wurde eine basentriplettbezogene Randomisierung (NNK) gewählt, da hier nur ein zusätzliches Cystein auftreten konnte. Wären alle vier organischen Basen an jeder Position eines Codons zugelassen, würde die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens eines für Cystein kodierenden Triplets in der Inhibitorschleife verdoppelt. Insgesamt kann so durch die Anzahl an variierten Resten und der 20 kodierten kanonischen Aminosäuren eine theoretische Diversität der Bibliothek von 10<sup>20</sup> verschiedenen Miniproteinvarianten erzeugt werden. Die Bibliotheken wurden durch das von Boder *et al.* etablierte Aga1p/Aga2p-System auf der Oberfläche der Bäckerhefe *S. cerevisiae* präsentiert, da die funktionale Exposition der cystinknotenbasierten Variantenbibliotheken durch ein eukaryotisches Faltungssystem begünstigt wird.<sup>140,150</sup> Die Generierung und die Durchmusterung der Bibliotheken stellten sich hierbei als kritische Punkte heraus.

#### 4.3.1.2 Design der MCoTI(SloI)-Bibliotheken

Die Auswahl der zu variierten Aminosäurereste im Fall der MCoTI(SloI)-Bibliothek erfolgte basierend auf der durch Heitz *et al.* veröffentlichten NMR-Struktur des Miniproteins MCoTI-II.<sup>172</sup> Im Gegensatz zur SOTI-III-Bibliothek wurde sich hierbei nicht auf den Bereich der Inhibitorschleife beschränkt. Insgesamt wurden 17 der 30 Reste des Miniproteins in das Design der Bibliothek einbezogen. Für die MCoTI(SloI)-Bibliothek wurde eine positionsspezifische codonbasierte Randomisierung der Aminosäurereste gewählt.<sup>127</sup> Zusätzlich sollten Serinproteaseinhibitoren aus dieser Bibliothek isoliert werden, wodurch die Modifikation des P<sub>1</sub>-Restes so gewählt wurde, dass immer ein Arginin oder Lysin (jeweils 50 %) als P<sub>1</sub>-Rest vorlag (Abb. 4.13). Außerdem sollte die Konformation der Inhibitorschleife weitgehend bewahrt bleiben, was durch den Erhalt des Prolins an Position 5 erzielt werden sollte. Diese Funktion der Aminosäure wurde ebenfalls in verschiedenen anderen Proteaseinhibitoren beobachtet.<sup>164,166,167,231</sup> Zusätzlich ist bekannt, dass Pro als P<sub>2</sub>-Rest an dieser Position essentiell ist.<sup>166,167</sup> Die Aminosäurereste 7-10 wurden voll randomisiert, um für alle 19 kanonischen Aminosäuren außer Cystein zu kodieren (Abb. 4.13).

Zusätzlich wurden benachbarte Regionen der Inhibitorschleife in das Randomisierungsschema einbezogen, um mögliche additive Effekte durch Bindung weiterer Bindungstaschen zu erzielen (Abb. 4.13) und Spezifität sowie Affinität isolierter Inhibitoren zu erhöhen. Eine volle Randomisierung dieser benachbarten Regionen wurde jedoch vermieden, da dies die Faltung und Stabilität des Miniproteins beeinflussen könnte. Somit wurden diese Positionen randomisiert, die ursprüngliche Aminosäure an dieser Position jedoch in 50 % aller Fälle erhalten. Des Weiteren liegt die N-terminale Schleife des Inhibitors in direkter Nähe zur Inhibitorschleife und kann ebenfalls die Bindung zum Zielprotein (Protease) beeinflussen. Der Einfluss dieser Reste auf Faltung und Stabilität wurde zuvor am analogen Cystinknoten EETI untersucht.<sup>141,231</sup> Da dieser Bereich eine wichtige Rolle in der frühen Faltungsphase des Cystinknotens während der Ausbildung des Typ II  $\beta$ -turns spielt<sup>232,233</sup>, wurden diese Positionen nur zu 10 % mit allen 19 kanonischen Aminosäuren variiert und zu 90 % die ursprünglichen Reste beibehalten (Abb. 4.13). Diese moderate Randomisierung wurde auch auf die Positionen

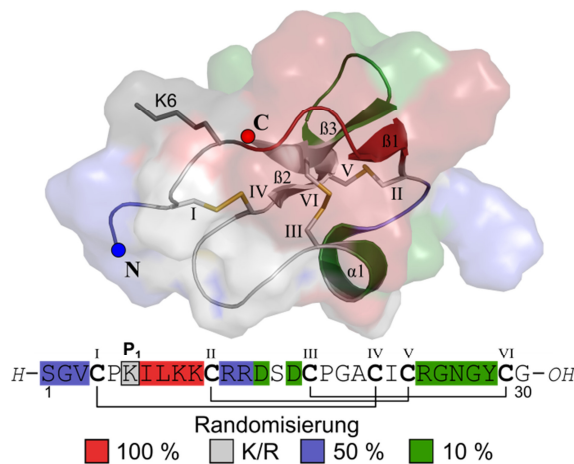


Abb. 4.13: Design der MCoTI(SloI)-Variantenbibliothek. Variierte Bereiche des Inhibitors sind im Cartoon (PDB: 1ha9)<sup>172</sup> und der Sequenz des Wildtypmoleküls farbig illustriert. Cystein-Reste sind fett sowie nummeriert und Disulfidbrücken in Gelb oder als schwarzen Linien dargestellt.

14 und 16 adaptiert (Abb. 4.13), da diese Asparaginsäure-Reste in der Inhibitor-Cystinknoten-Familie konserviert sind und die Stabilisierung des Miniproteins gewährleisten.<sup>166,167</sup> Das aktive Zentrum der TTSP Matriptase-1 ist jedoch negativ geladen, wodurch ein Austausch dieser Reste von Vorteil für die Bindung des Moleküls sein könnte.<sup>117,118</sup> Insgesamt werden sechs bis acht Mutationen der 17 in die Randomisierung einbezogenen Resten erwartet, wobei davon vier in der Inhibitorschleife auftreten sollten.<sup>223</sup>

## 4.3.2 Generierung und Charakterisierung der Miniproteinbibliotheken

### 4.3.2.1 Produktion und Reinigung des pCT-Vektorfragmentes

Für die Erzeugung der Miniproteinvariantenbibliotheken nach Benatuil *et al.*<sup>154</sup> wurden zunächst präparative Mengen hochreiner doppelsträngiger Vektor-DNA benötigt. Hierfür wurden *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem Vektor pCT-Trx-VHH (2.2.3) transformiert (3.1.4) und Einzelklone auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten selektiert (3.1.3). Ein positiver Klon wurde dann in 2 L Ampicillin-haltigen dYT-Medium über Nacht kultiviert (3.1.3) und am Folgetag sedimentiert. Im Anschluss erfolgte die präparative Isolierung und Reinigung der doppelsträngigen Vektor-DNA (3.2.5.2). Wie in Abb. 4.14 zu sehen ist, konnte durch die Dichtegradientenzentrifugation die *supercoiled* Vektor-DNA von linearisierten DNA-Fragmenten getrennt und durch Punktion des Zentrifugenröhrchens separiert werden. Nach Auswaschen des in der Probe enthaltenen Ethidiumbromids durch Isoamylalkohol wurde die Vektor-DNA präzipitiert, getrocknet (3.2.1) und in Aqua bidest aufgenommen. Insgesamt konnten 5 mg des Vektors pCT-Trx-VHH in *supercoiled* Form aus 2 L *E. coli* Kultur isoliert und gereinigt werden. Für die Integration der Miniproteinvariantenbibliotheken durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* wurde der Vektor im präparativen Maßstab mit dem Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nhe*I verdaut. Zu diesem Zweck wurden 200  $\mu$ g des Plasmids mit 50 Units der Endonukleasen in einem Volumen von 200  $\mu$ L unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen über Nacht bei 37 °C gespalten (3.3.1). Nach Analyse der Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.3) wurde das Vektor-Fragment durch Sucrose-

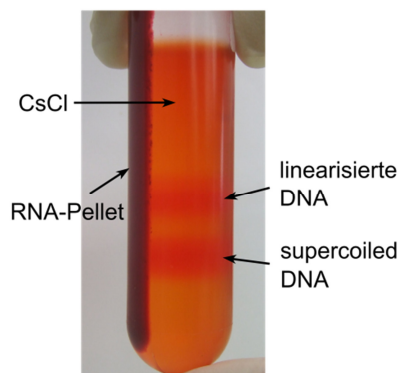


Abb. 4.14: CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation des aus *E. coli* isolierten Vektors pCT-Trx-VHH.

dichtegradientenzentrifugation (3.2.8) von dem herausfallenden VHH-Fragment getrennt. Der Gradient wurde nach Punktion des Röhrchens in Fraktionen gesammelt und diese *via* Gelelektrophorese (3.2.3) auf Separierung des Vektor-Fragments überprüft. Im Anschluss wurden die Fraktionen mit isoliertem Vektor-Fragment vereinigt und mit Hilfe von Ethanol und Ammoniumacetat präzipitiert (3.2.1). Das nun vorliegende

---

lineare Vektor-Fragment wurde anschließend in Aqua bidest aufgenommen und die Konzentration in Lösung vorliegender DNA ermittelt (3.2.7).

#### 4.3.2.2 Erstellung der SOTI-III-Bibliothek

Für die Erzeugung der Bibliothek in *S. cerevisiae* basierend auf dem Trypsininhibitor SOTI-III wurde das Protokoll von Benatuil *et al.* genutzt.<sup>154</sup> Um Bibliotheken mit ausreichender Größe und Diversität zu generieren, werden hierfür präparative Mengen an DNA für die Transformation des Hefestamms EBY100 benötigt. Das linearisierte Vektor-Fragment wurde bereits, wie unter 4.3.2.1 beschrieben, erzeugt. Das durch homologe Rekombination zu integrierende DNA-Fragment, welches die Miniproteinvariantenbibliothek kodiert, wurde durch PCR erstellt. Für die erste PCR wurden die Oligonukleotide SOTI-III\_wt\_up und SOTI-III\_ran\_lo (NNK) verwendet (Tabelle 2.1) sowie eine Elongationszeit von 30 s gewählt (3.3.2). Im Anschluss wurden in einer zweiten PCR homologe Bereiche unter Verwendung der Oligonukleotide SOTI-III-ol-up und pCT-lib-rev (lo) angebracht (Tabelle 2.1). Das Produkt der ersten PCR wurde als Matrize für die zweite PCR eingesetzt und im präparativen Maßstab (96 Reaktionen) mit gleichbleibenden Elongationszeiten durchgeführt (3.3.2). Das Entstehen des PCR-Produkts wurde mittels Gelelektrophorese stichprobenartig überprüft (3.2.3). Anschließend wurden die PCR-Reaktionen vereinigt und das erzeugte PCR-Produkt einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2) gefolgt von einer Präzipitation mittels Ethanol und Ammoniumacetat (3.2.1) unterzogen. Nach dem Trocknen und Aufnehmen der DNA in Aqua bidest wurde die Konzentration des in Lösung vorliegenden PCR-Produkts ermittelt (3.2.7). Die Transformation von EBY100 für die Erzeugung der SOTI-III-Bibliothek wurde dann wie unter 3.1.7 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden drei Unterbibliotheken durch jeweils zwölf Transformationsreaktionen erstellt, wobei für jede Transformation 5 µg Vektor-Fragment und 12 µg *insert*-DNA eingesetzt wurden (3.1.7). Durch Erstellung serieller Verdünnungen konnte anschließend die Anzahl der Primärtransformanten bestimmt werden. Außerdem wurden im Anschluss Einzelklone auf die erfolgreiche Integration der Miniproteinvarianten durch Kolonie-PCR überprüft (3.3.3). Wie in Tabelle 4.1 zu sehen ist, konnte die SOTI-III Variantenbibliothek bestehend aus drei Unterbibliotheken erfolgreich erstellt werden.

Tabelle 4.1: Auflistung der erzeugten SOTI-III Variantenbibliotheken

Bibliothek	Klonanzahl	Klone mit Insert (%)	Klonanzahl mit Insert
SOTI-III Bib. 1	$1,3 \cdot 10^7$	80	$1 \cdot 10^7$
SOTI-III Bib. 2	$1,5 \cdot 10^8$	80	$1,2 \cdot 10^8$
SOTI-III Bib. 3	$1,5 \cdot 10^8$	80	$1,2 \cdot 10^8$
Insgesamt	$3,13 \cdot 10^8$	80	$2,5 \cdot 10^8$

Mit einer Größe von  $2,5 \cdot 10^8$  Klonen, die das zu integrierende DNA-Fragment aufweisen, konnte eine weitere Charakterisierung und Validierung der Bibliothek erfolgen. Zuvor wurden jedoch wie unter 3.1.5 beschrieben Gefrierkulturen der Bibliotheken zur dauerhaften Lagerung erstellt.

#### 4.3.2.3 Charakterisierung der SOTI-III-Bibliothek mittels 454-Sequenzierung

Eine detaillierte Analyse der Bibliothek auf DNA-Ebene erfolgte durch 454-Sequenzierung der SOTI-III-Bibliothek. Hierfür wurde zunächst aus je einer Gefrierkultur jeder Unterbibliothek die Vektor-DNA isoliert (3.2.6). Anschließend wurden diese als Matrize in einer PCR (3.3.2) mit einer Elongationszeit von 30 s zum Anbringen bekannter MID-Sequenzen genutzt. Dabei fanden die Oligonukleotide pct-basic-mid4-up und pct-basic-mid10-low Verwendung (Tabelle 2.1). Wie unter 3.2.9 beschrieben wurden daraufhin die erhaltenen PCR-Produkte als Matrize in einer em-PCR für die spezifische Kopplung an für die Sequenzierung essentielle Partikel eingesetzt. Im Anschluss sollte je Mizelle ein Partikel mit einem daran gekoppelten und amplifizierten PCR-Produkt vorliegen. Die Sequenzierung der Bibliothek wurde wie unter 3.2.9 dargestellt, entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und analysiert. Insgesamt konnten 4.437 Sequenzen mit der entsprechenden MID-Erkennungssequenz erfasst werden. Bei 2.951 war das vollständige PCR-Produkt nachweisbar. 1.848 dieser Sequenzen wiesen sechs Cysteine an der entsprechenden Position auf, womit 62,6 % der ausgewerteten Sequenzen in funktionaler Form vorlagen. In den restlichen 37,4 % der Sequenzen fehlten Cysteinreste oder es lagen Verschiebungen des Leserasters vor.

Insgesamt konnten 1.772 unique Sequenzen identifiziert werden. In 71 Fällen (4,2 %) lagen Duplikate vor. Des Weiteren wurde die codierende Sequenz des cMyc-Epitops in 1.657 Fällen nachgewiesen. In 491 Fällen der 1.848 funktionalen Sequenzen (26,6 %)

lag ein Stopcodone im Bereich der Inhibitorschleife vor. Außerdem traten in 701 Fällen der funktionalen Sequenzen zusätzliche Cysteine in der Inhibitorschleife auf.

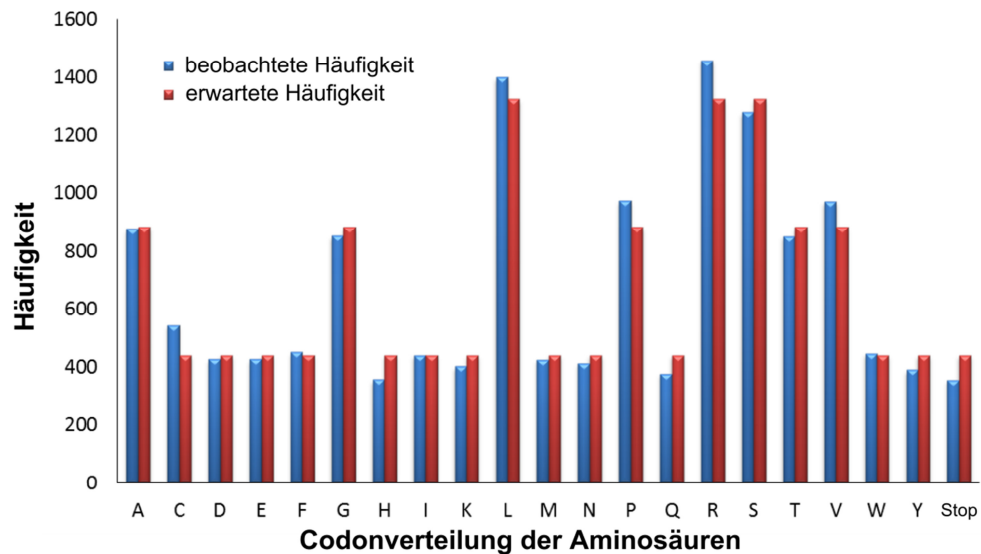


Abb. 4.15: Darstellung der Häufigkeiten von Aminosäuren im Bereich der randomisierten Inhibitorschleife der SOTI-Bibliothek. Zusätzlich wird die erwartete Häufigkeit (rot) mit der beobachteten (blau) verglichen. Für die Darstellung wurden 1.772 unique Sequenzen ausgewertet.

Danach wurde die Häufigkeit der Aminosäuren im randomisierten Bereich der Inhibitorschleife des Miniproteins untersucht. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes sowie der NNK-Randomisierung des Inhibitors ergaben sich Erwartungswerte für das Auftreten der Aminosäure- und Stop-Codone. Für den Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchsdaten wurden alle funktional vorliegenden Inhibitorsequenzen ausgewertet und verglichen. In Abb. 4.15 sind die beobachteten Häufigkeiten der Aminosäuren (blau) mit den erwarteten Häufigkeiten (rot) im Vergleich dargestellt. Da bestimmte Aminosäuren durch mehrere Codone verschlüsselt werden, ist zu berücksichtigen, dass keine Gleichverteilung des Auftretens der Aminosäuren vorliegt. So werden beispielsweise Arginin, Serin und Leucin im Gegensatz zu Tryptophan und Methionin nicht durch ein sondern durch sechs Codone verschlüsselt. Durch die NNK-Randomisierung werden nur noch 32 der 64 in der Natur vorkommenden Codone für die Verschlüsselung der Aminosäuren bedient, wodurch sich die Verteilung nochmals ändert. Arginin, Serin und Leucin werden nun durch drei Codone kodiert und treten dreimal häufiger auf als beispielsweise Histidin und Lysin. Diese Beobachtung wird in Abb. 4.15 durch die Erwartungswerte dargestellt und durch die ermittelten Häufigkeiten der Aminosäuren in der randomisierten Inhibitorschleife funktionaler Sequenzen belegt.



---

#### 4.3.2.4 Charakterisierung der MCoTI(SloI)-Bibliothek

Im Gegensatz zur SOTI-III-Bibliothek wurden die MCoTI-Bibliotheken nach einer neuartigen Gensynthese<sup>127</sup> durch die Firma Sloning BioTechnology synthetisiert und mittels Hochdurchsatzsequenzierung charakterisiert. Die prozessierten und ausgewerteten Daten zeigen die Qualität der synthetisierten Miniproteinvariantenbibliotheken. Von 30.006 Sequenzen ließen sich 29.535 eindeutig auslesen. Hiervon konnten 26.762 Klone als völlig korrekt vorliegend identifiziert werden, was 90,6 % der gesamten Sequenzen entspricht. Von diesen vollständig korrekten Varianten lagen 87,5 %, was 25.846 Sequenzen entspricht, einmalig vor. Nur 3 % der Klone (880 Sequenzen) konnten als Duplikate beziehungsweise 0,1 % (36 Sequenzen) als Triplikate identifiziert werden. 9,4 % der Sequenzen wiesen unerwartete Fehler wie Deletionen, Insertionen oder Sequenzierungsartefakte auf. Bei 0,07 % der Klone (20 Sequenzen) lagen Stop-Codone vor, wohingegen in 0,4 % der analysierten Varianten (117 Sequenzen) unerwartete Triplets auftraten.

Die Auswertung erfolgte außerdem für jede einzelne der 17 randomisierten Positionen des Miniproteins. Auch diesbezüglich wurde wiederum die vorliegende Verteilung der Aminosäuren basierend auf den analysierten Sequenzdaten mit der erwarteten Verteilung verglichen. In Abb. 4.16 ist dieser Vergleich dargestellt und zeigt deutlich, dass eine weitgehende Übereinstimmung der erhaltenen Aminosäureverteilungen mit den erwarteten erreicht wurde. Beispielsweise ist das erste in der Sequenz vorliegende Serin zu 50 % mit allen natürlich vorkommenden Aminosäuren (außer Cystein) randomisiert. Dementsprechend sollte in der einen Hälfte der ausgewerteten Sequenzen ein Serin und in der anderen Hälfte alle anderen Aminosäuren auftreten.

Trotz Abweichungen von bis zu 15 %-Punkten in der Aminosäureverteilung an verschiedenen Positionen weist die synthetisierte Bibliothek eine hohe Qualität und Diversität auf. Beispielsweise ist bezüglich des zu 50 % mit Arginin randomisierten P<sub>1</sub>-Rest Lysin6 eine Abweichung von ca. 15 %-Punkten zu konstatieren. Ebenfalls sind bei der zu 10 % randomisierten Asparaginsäure an Position 14 Abweichungen zu den Erwartungswerten erkennbar. Hier liegt in etwa 25 % der Klone nicht die ursprüngliche Aminosäure vor gegenüber einem erwarteten Wert von 10 %.



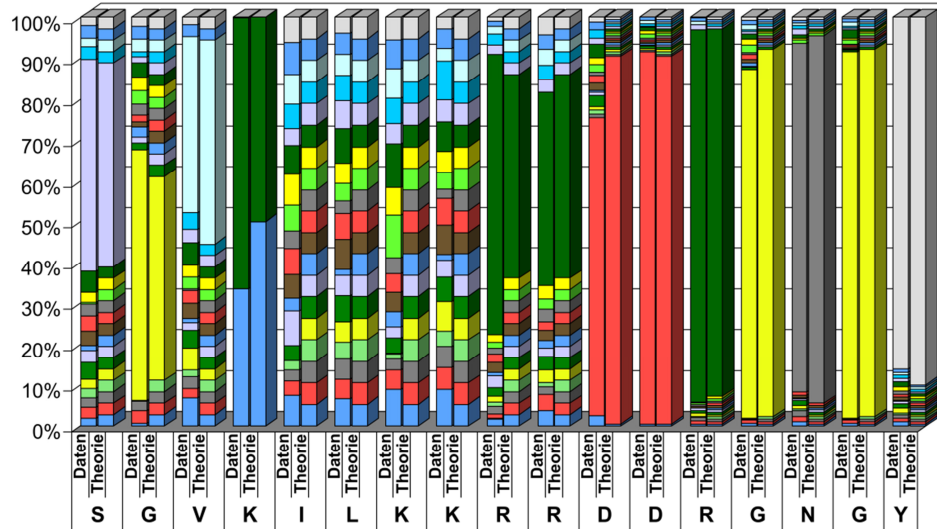


Abb. 4.16: Positionsbezogene Auswertung und Vergleich der Aminosäureverteilung der sequenzierten MCoTI(SloI)-Variantenbibliothek. Die Abbildung wurde den Unterlagen der Firma Sloning BioTechnologies GmbH entnommen und modifiziert dargestellt. Hierbei kodiert jede Farbe das Auftreten einer speziellen Aminosäure. In Säulen sind jeweils nebeneinander die erwartete und die beobachtete Aminosäureverteilung (Daten) dargestellt.

Unter Berücksichtigung der gewichteten Randomisierung faltungssensitiver Reste stellt dies die erste, auf diese Weise erzeugte und charakterisierte Miniproteinvariantenbibliothek dar.

#### 4.3.2.5 Erstellung der MCoTI-Bibliotheken

Die Erstellung der MCoTI-Bibliotheken erfolgte wie zuvor beschrieben (3.1.7). Das hierfür benötigte Vektor-Fragment stand bereits für die Transformation von *S. cerevisiae* zur Verfügung. Das zu integrierende DNA-Fragment mit homologen Bereichen für HR in Hefe wurde zu diesem Zweck durch PCR erzeugt (3.3.2). Die durch die Firma Sloning BioTechnology GmbH (Puchheim) synthetisierten Genvariantenbibliotheken wurden mit den Oligonukleotiden MC\_slo\_ysc\_up und McoTI\_Ysc2\_lib\_lo (Tabelle 2.1) im präparativen Maßstab (48 PCR-Reaktionen) amplifiziert. Mit Elongationszeiten von 30 s und einer Annealing-Temperatur von 52 °C konnten homologe Bereiche für die Rekombination in Hefe installiert werden. Die PCR-Reaktionen wurden stichprobenartig mittels Gelelektrophorese (3.2.3) auf die Erzeugung der PCR-Produkte überprüft. Im Anschluss wurden die PCR-Reaktionen vereinigt, die DNA durch Phenol sowie Chloroform gereinigt (3.2.2) und präzipitiert (3.2.1). Dieses Verfahren diente zur Erzeugung integrationsfähiger DNA-Fragmente der MCoTI(SloI)- und MCoTI(SloII)-Bibliothek. Die Bibliotheken unterscheiden sich nur in Bezug auf die Randomisierung

zweier Aminosäurepositionen. Das Design der MCoTI(SloI)-Bibliothek ist unter 4.3.1.2 beschrieben. Im Falle der MCoTI(SloII)-Bibliothek wurden im Gegensatz zur ersten Bibliothek alle sechs Aminosäurereste der Inhibitorschleife zu 100 % randomisiert. Dementsprechend wurde das Design dieser Bibliothek nicht auf Serinproteasen ausgerichtet, wodurch ein breiteres Spektrum an Zielproteinen adressiert werden sollte. Für die Erstellung der Miniproteinbibliotheken wurden wie zuvor im Falle der SOTI-III-Bibliothek 5 µg Vektor-Fragment und 12 µg *insert*-DNA je Transformationsreaktion eingesetzt.

Tabelle 4.2: Auflistung der erstellten MCoTI Variantenbibliotheken

Bibliothek	Klonanzahl	Klone mit Insert (%)	Klonanzahl mit Insert
MCoTI(SloI)	$2,3 \cdot 10^7$	100	$2,3 \cdot 10^7$
MCoTI(SloII)	$2,2 \cdot 10^8$	100	$2,2 \cdot 10^8$
Insgesamt	$2,43 \cdot 10^8$	100	$2,4 \cdot 10^8$

Für jede Bibliothek wurden zwölf Transformationen entsprechend dem Protokoll nach Benatuil *et al.* durchgeführt<sup>154</sup> (3.1.7) und die Anzahl der erzeugten Transformanten durch Ausstreichen serieller Verdünnungen ermittelt. Im Anschluss wurden mehrere Einzelklone auf die erfolgreiche Integration der Miniproteinvarianten mittels Kolonie-PCR überprüft (3.3.3). Wie in Tabelle 4.2 dargestellt, ergab sich eine Klonanzahl mit *insert* von  $2,3 \cdot 10^7$  für die MCoTI(SloI)- beziehungsweise  $2,2 \cdot 10^8$  im Falle der MCoTI(SloII)-Bibliothek.

### 4.3.3 Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin und Charakterisierung der isolierten SOTI-III Varianten

#### 4.3.3.1 Selektion der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin aus Rinderpankreas

Im folgenden Abschnitt wurde die funktionale Präsentation der Miniproteinvariantenbibliotheken auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* überprüft. Anhand einer Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf die Serinprotease Trypsin wurde der experimentelle Aufbau validiert. Außerdem war durch diese Versuche die Volllängen-Expression der Varianten nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurde die SOTI-III-Bibliothek ausgehend von zuvor erstellten Kryokulturen kultiviert (3.1.5) und am Folgetag die Zelldichte der Kultur ermittelt (3.1.2). Im

---

Anschluss wurde eine Zellzahl, die der zehnfachen Diversität der Bibliothek entspricht, bei 20 °C kultiviert und induziert (3.1.6). Um eine Vollängen-Expression des Fusionsproteins, bestehend aus Aga2p und Miniprotein, auf der Hefeoberfläche nachzuweisen, wurde vor jeder Sortierung eine Nachweis des cMyc-Epitops durchgeführt (3.6.1).

Während jeder Selektionsrunde sollte eine Zellzahl, die der zehnfachen Diversität der Bibliothek entspricht, durchmustert werden. Hierfür mussten im Falle der SOTI-III-Bibliothek  $2,5 \cdot 10^9$  Hefezellen in der primären Runde selektiert werden. Da nur 63 % aller Varianten in funktioneller Form vorliegen und zusätzlich davon 27 % ein Stop-Codon in der Sequenz aufweisen, musste die Anzahl der zu durchmusternden Zellen in der ersten Selektionsrunde folglich nochmals erhöht werden. Um eine Durchmusterung dieser Zellzahl zu gewährleisten, wurden die Zellen in der primären Runde mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) separiert. Hierfür wurden mit Streptavidin beschichtete *MicroBeads* mit 1  $\mu$ M biotinyliertem Trypsin, welches zuvor wie unter 3.4.7 beschrieben erzeugt wurde, für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe eines Magnetständers separiert und mehrfach mit PBS gewaschen. Bevor nun die Selektion der Bibliothek erfolgen konnte, wurden unspezifisch bindende Hefezellen nach Präinkubation mit streptavidinbeschichteten *MicroBeads* für 30 min abgetrennt. Die anschließende Selektion trypsinbindender Hefezellen erfolgte mit Hilfe der LD-Säulen sowie einem Magnetständer der Firma Miltenyi Biotec und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die induzierten und abgereicherten Hefezellen wurden hierfür 30 min auf Eis mit Trypsin-beschichteten *MicroBeads* inkubiert. Separierte Hefezellen wurden nach jeder Selektionsrunde in 50 mL SDCAA-Medium rekultiviert (3.1.5) und erneut induziert (3.1.6). Zusätzlich wurden serielle Verdünnungsplattierungen auf selektiven Medienplatten erstellt, um die Überlebensrate der separierten Zellen zu ermitteln.

Für eine weitere Durchmusterung der Bibliothek mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS, 3.6.3) erfolgte eine Doppelmarkierung der Hefezellen wie unter 3.6.2 beschrieben. Insgesamt wurden drei Sortierungsrunden durchgeführt, wobei in der zweiten und dritten Selektionsrunde eine direkte Resortierung der separierten Hefezellen erfolgte. Die Versuchsdaten dieser Durchmusterung sind in Abb. 4.17 zusammengefasst. Anhand der dargestellten Dotplots ist deutlich zu erkennen, dass nach primärer Selektion *via* MACS im Verlauf von drei Sortierungszyklen mittels FACS eine Population trypsinbindender Hefezellen angereichert werden konnte.

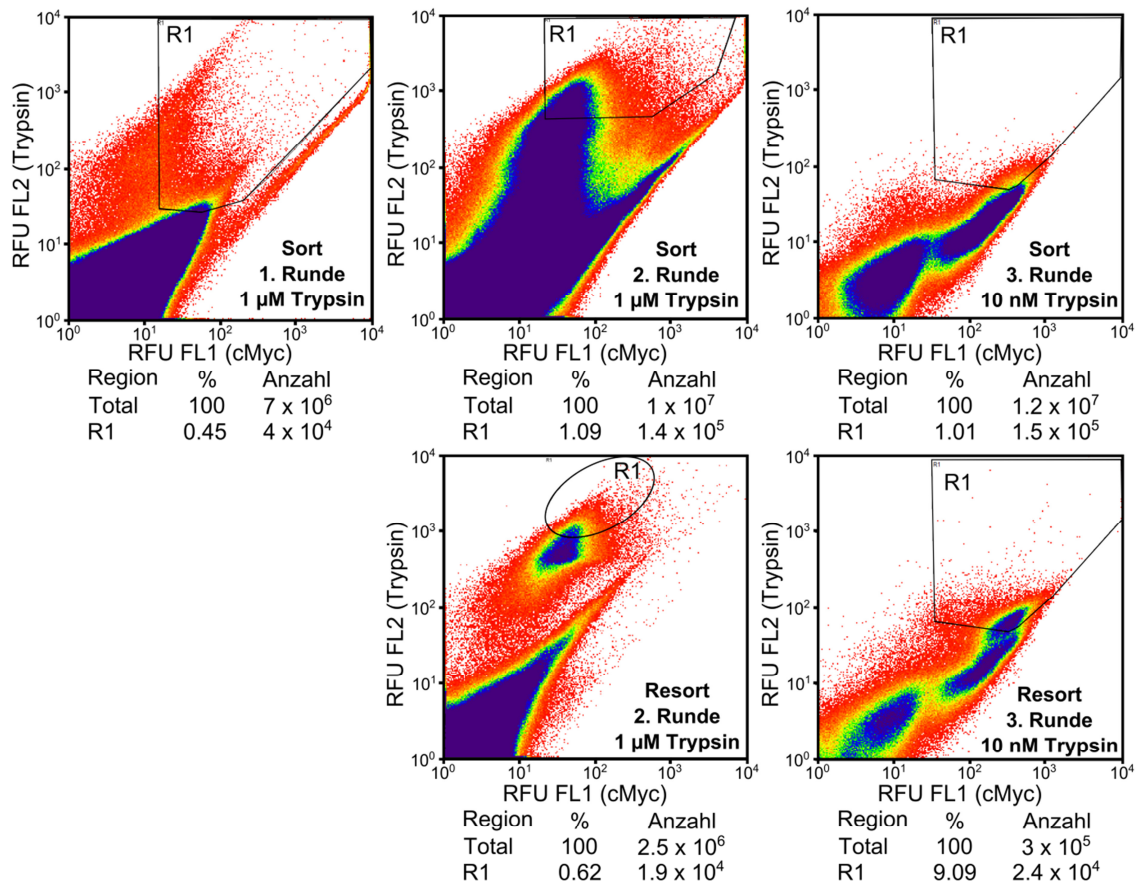


Abb. 4.17: FACS-Daten der Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin aus Rinderpankreas. Gezeigt sind zweidimensionale Dotplots der ersten bis dritten Selektionsrunden (von links nach rechts). Im Fall von Resortierungen der selektierten Zellen sind diese unter der entsprechenden Runde dargestellt. Für die Selektion erfolgte eine zwei-Farben Markierung der induzierten Hefebibliothek. R1 beschreibt in allen Dotplots die Region der separierten Zellen. In den Darstellungen indiziert der Farbwechsel von Rot zu Blau eine Zunahme der Zellzahl in dem entsprechenden Bereich. Unter den Grafiken sind die Gesamtzahl sowie die Zahl der aussortierten Ereignisse dargestellt. Die gewählte Trypsinkonzentration je Runde ist in jedem Dotplot unten rechts beschrieben. Die Abszisse zeigt die logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz (RFU) FL1 eines FITC-gekoppelten Antikörpers, durch den ein cMyc-spezifischer Antikörper nachgewiesen wird. Die Ordinate beschreibt die logarithmisch aufgetragene RFU FL2 des SAPE-Konjugats, durch das die biotinylierte Protease detektiert wird.

Die selektierten Zellen weisen sowohl eine relative Fluoreszenz (RFU) des cMyc-Epitop (FL1, nach rechts) als auch eine deutliche Verschiebung zum Fluoreszenzsignal der Protease (FL2, nach oben) auf. In den Runden eins und zwei wurde eine Proteasekonzentration von  $1 \mu\text{M}$  gewählt, wodurch die Verschiebung noch deutlicher zu sehen ist. Um die Stringenz der Selektion zu erhöhen wurde die Trypsinkonzentration in der dritten Selektionsrunde auf  $10 \text{ nM}$  reduziert. Auch bei drastischer Reduktion der Konzentration des Zielproteins zeichnet sich eine zweite Population Hefezellen ab, die ausschließlich ein Signal des cMyc-Epitops aufweisen und somit kein Trypsin binden.

---

#### 4.3.3.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften trypsinbindender SOTI-III Varianten

Um nun auf Trypsin selektierte Einzelklone der Bibliothek auf ihre Bindungseigenschaften zu analysieren, wurden 15 Kolonien der Verdünnungsplattierungen über Nacht in 5 mL SDCAA-Medium inokuliert (3.1.5) und anschließend wurde die Oberflächenpräsentation der Miniproteinvariante durch Medienwechsel induziert (3.1.6). Die Bindungseigenschaften konnten nach einer Doppelmarkierung von fünf Einzelklonen (3.6.2) mittels Durchflusszytometrie (3.6.3) analysiert werden. Alle weiteren Einzelklone wurden nur auf Bindung von Trypsin überprüft. Da alle Inhibitoren gleich behandelt wurden, sollten die Bindungseigenschaften in Bezug auf die Präsentation korrelieren. Für einen Vergleich wurde der Wildtyp des Inhibitors SOTI-III parallel kultiviert, induziert und nach Doppelmarkierung der Zellen *via* Durchflusszytometrie analysiert. Für die Doppelmarkierung der SOTI-III Varianten wurden 1,3  $\mu$ M biotinyliertes Trypsin (3.4.7) eingesetzt. Die sich aus diesen Messungen ergebenden Versuchsdaten von fünf Einzelklonen und des Wildtyps des Miniproteins sind in Abb. 4.18 dargestellt. Am Beispiel des Inhibitors SOTI-III *wt* (Abb. 4.18, oben links) ist zu erkennen, dass eine Population der Hefezellen (rote Elipse) sowohl ein Fluoreszenzsignal des cMyc-Epitops (RFU FL1) als auch für Trypsin (RFU FL2) aufweisen. Diese Zellen sind im Vergleich zu nicht markierten Hefen nach rechts oben im Dotplot verschoben und machen mehr als 80 % der analysierten Ereignisse im oberen rechten Quadranten des Dotplots aus. Die Einstellungen der Quadranten sowie die Markierung der Hefepopulation mit beiden Fluoreszenzsignalen (rote Ellipse) wurden für die Analyse der weiteren Einzelklone übertragen. Bei allen analysierten Einzelklonen liegt eine zweifach markierte Population von Hefezellen im oberen rechten Quadranten Q2-UR vor, die zusätzlich ein ähnliches Signal des detektierten Trypsins aufweisen. Unterschiede liegen in der Signalthöhe des durch Antikörper nachgewiesenen cMyc-Epitops. Lediglich EK2 weist ein geringeres FL1-Signal der Population auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass keine Markierung des cMyc-Epitops erfolgte. Da diese Abweichungen den Nachweis der Expression des Fusionsproteins nicht drastisch beeinflussen und bei jeder Variante ein Signal der Protease-Markierung (RFU FL2) vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass alle Einzelklone Trypsin binden (Abb. 4.18). Zusammenfassend konnte bei 15 analysierten Einzelklonen eine Bindung der Protease belegt werden.

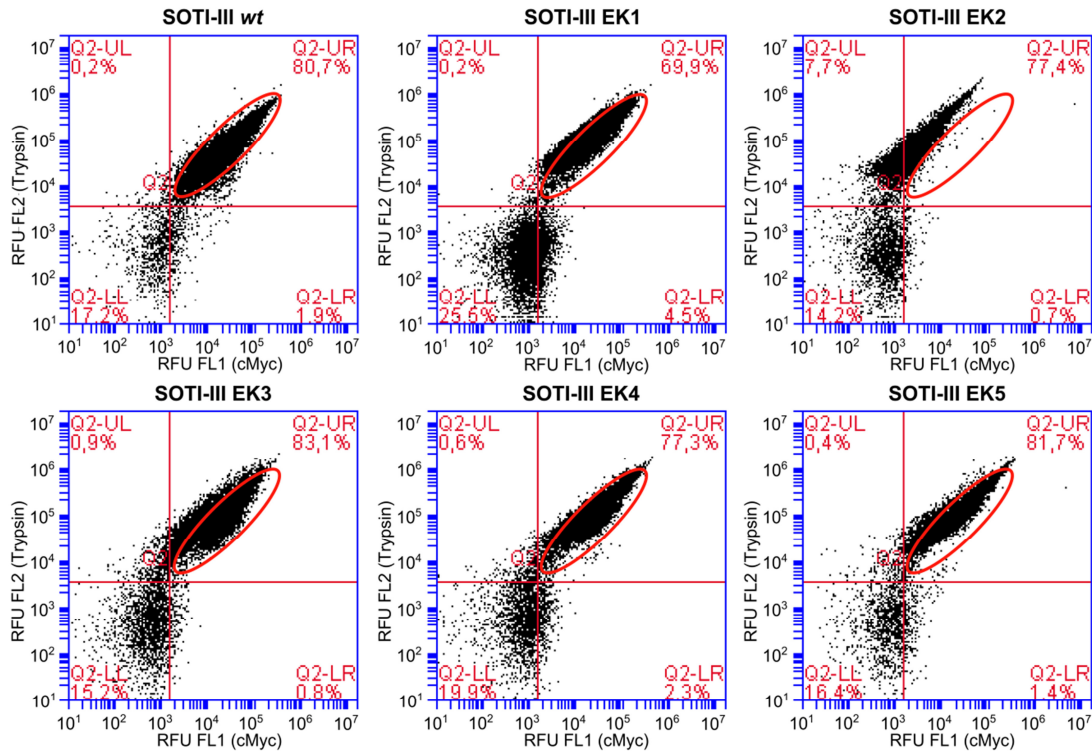


Abb. 4.18: Zweidimensionale Dotplots der Bindungsanalyse des Miniproteins SOTI-III sowie fünf selektierter Varianten. Die Abszisse zeigt die logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz (RFU) FL1 eines FITC-gekoppelten Antikörpers, durch den ein cMyc-spezifischer Antikörper nachgewiesen wird. Die Ordinate beschreibt die logarithmisch aufgetragene RFU FL2 des SAPE-Konjugat, das die biotinylierte Protease detektiert. Zum Vergleich ist die Hauptpopulation der zweifach markierten Hefezellen des Wildtyps in allen Grafiken durch eine rote Ellipse dargestellt. Für eine detaillierte Analyse sind die Abbildungen durch zusätzlich Quadranten untergliedert. Für die Messungen wurden die Zellen mit 1,3  $\mu$ M biotinyliertem Trypsin markiert und  $5 \cdot 10^4$  Ereignisse analysiert.

#### 4.3.3.3 Sequenzierung der auf Trypsin selektierten SOTI-III Varianten

Die isolierten Klone wurden anschließend sequenziert. Dazu wurde die Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* isoliert (3.2.6), *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (3.1.4) und durch Kultivierung amplifiziert (3.1.3). Nach erneuter Isolierung der Plasmide erfolgte die Sequenzierung mit Hilfe des Oligonukleotids pCT-seq-lo durch die Firma SeqLab (Göttingen). Die Analyse der Sequenzen erfolgte anschließend mit Hilfe des Programms ApE. Anschließend wurde ein Alignment der Sequenzen unter Zuhilfenahme des Programms BioEdit angefertigt.

Wie in Abb. 4.19 zu sehen, weisen alle selektierten SOTI-III Varianten eine Sequenzübereinstimmung der konstanten Bereiche zum Wildtyp auf. Lediglich Einzelklon 2 weist eine Punktmutation im Bereich des sechsten Cysteins auf, wodurch an dieser Position ein Arginin vorliegt. Durch die Mutation des Cysteins wird die Faltung und Stabilität des





spätere Identifikation der Sequenzdaten an den amplifizierten Gen-Fragmenten installiert werden. Die Kopplung der PCR-Produkte an für die Sequenzierung essentiellen Partikeln erfolgte im Anschluss durch eine emPCR. Die Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren wurde anschließend wie unter 3.2.9 beschrieben durchgeführt.

Aus der Sequenzierung gingen nach Auswertung der Daten 1.137 funktional vorliegende Inhibitorsequenzen im Falle der zweiten Selektionsrunde bzw. 2.069 Sequenzen für die dritte Selektionsrunde hervor. Die prozessierten und ausgewerteten Sequenzen sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Anhand der Häufigkeit und dem prozentualen Vorkommen bestimmter Sequenzen lässt sich eine Anreicherung ableiten und belegen. So stellt beispielsweise die schon zuvor erwähnte Sequenz –HIPTSWWRAR- nur 4,4 % der ausgewerteten Daten der zweiten Selektionsrunde. Nach einer darauf folgenden Durchmusterung mit stringenteren Selektionsbedingungen macht diese Variante mehr als 56 % der über 2.000 ausgewerteten Sequenzen aus. Dabei blieben mögliche Mehrfachsequenzierungen des gleichen Ausgangsmoleküls unberücksichtigt. Des Weiteren treten

Tabelle 4.3: Auswertung der Sequenzdaten der zweiten und dritten Selektionsrunde der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin. Aufgeführt sind die Varianten, deren Häufigkeit und Sequenz. Cystein-Reste sind

<b>2. Selektionsrunde der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin</b>			
<b>Variante</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>
38	118	10,38	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPPEWRRKNI <b>C</b> Q
4	108	9,50	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> GAGVPMHWRR <b>C</b> Q
24	93	8,18	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> AIPRDWLRAR <b>C</b> Q
47	68	5,98	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPAGWRRTRAR <b>C</b> Q
45	67	5,89	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPASWRRKGR <b>C</b> Q
28	66	5,80	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPVAWWKGGP <b>C</b> Q
32	64	5,63	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPTIWWGGTP <b>C</b> Q
18	50	4,40	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>CHIPTSWWRAR</b> <b>C</b> Q
37	44	3,87	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPRDYWRIK <b>C</b> Q
41	37	3,25	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPLDWRRNSV <b>C</b> Q

<b>3. Selektionsrunde der SOTI-III-Bibliothek auf Trypsin</b>			
<b>Variante</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>
12	1169	56,50	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>CHIPTSWWRAR</b> <b>C</b> Q
37	286	13,82	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPYSWRRRAV <b>C</b> Q
19	276	13,34	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> IPLSWRRLAP <b>C</b> Q
18	75	3,62	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> IPIAWRRMSK <b>C</b> Q
39	38	1,84	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPYSWWRHLR <b>C</b> Q



bei allen aufgeführten Varianten die zuvor beschriebenen Motive -WWR- oder -WRR- in der Sequenz der Inhibitorschleife auf. Somit bestätigen die Daten der Hochdurchsatzsequenzierung die Daten der Einzelsequenzierung und weisen Variante 12 als das dominanteste Bindemolekül aus.

#### 4.3.3.4 Synthese und biochemische Charakterisierung des SOTI-III R3 EK4

Der folgende Abschnitt soll klären, ob die trypsinbindende Variante (R3 EK4) des Mini-proteins SOTI-III ein Inhibitor der Serinprotease Trypsin ist. Für die biochemische Charakterisierung erfolgte eine Fmoc basierte Festphasenpeptidsynthese (3.4.8) des Knottins, welche von Dipl.-Ing. Michael Reinwarth durchgeführt wurde. Nach oxidativer Faltung (3.4.9) des Cystinknotens wurde das Syntheseprodukt durch HPLC (3.4.10.4) aufgereinigt und mittels LC-MS (3.4.11) auf eine vollständige Disulfidbrückenverknüpfung überprüft (Abb. 4.20). Um nun die Bindungseigenschaften der Miniproteinvariante zu ermitteln, wurde die Inhibitionskonstante ( $K_i$ , 3.5.3) bestimmt.

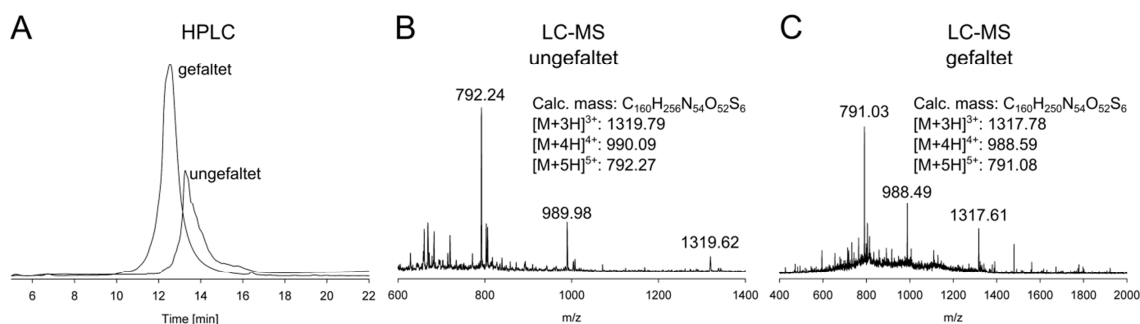


Abb. 4.20: Synthese und oxidative Faltung des auf Trypsin selektierten Miniproteins SOTI-III R3 EK4. **A:** HPLC-Verlauf der linearen Vorstufe sowie des gefalteten Peptids bei 220 nm. **B:** Massenspektrometrische Analyse (LC-MS) des in A gezeigten nicht oxidierten Miniproteins. **C:** Massenspektrometrische Analyse des in A dargestellten oxidierten Miniproteins.

Hierfür wurde zunächst die Konzentration des aktiven in Lösung vorliegenden Trypsins durch Titration des aktiven Zentrums ermittelt (3.5.1.). Anschließend konnte der Anteil des aktiven Inhibitors durch Titration der Protease bestimmt werden (3.5.2.). Ausgehend von den Konzentrationen der aktiven in Lösung vorliegenden Proteine wurde die apparente Inhibitionskonstante ( $K_i^{app}$ ) ermittelt (3.5.3.). Der Graph der Inhibitions-messung ist in Abb. 4.21 dargestellt. Die  $K_i$  des Inhibitors wurde anschließend mit Hilfe der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) für die Substratbindung berechnet (3.5.3.).

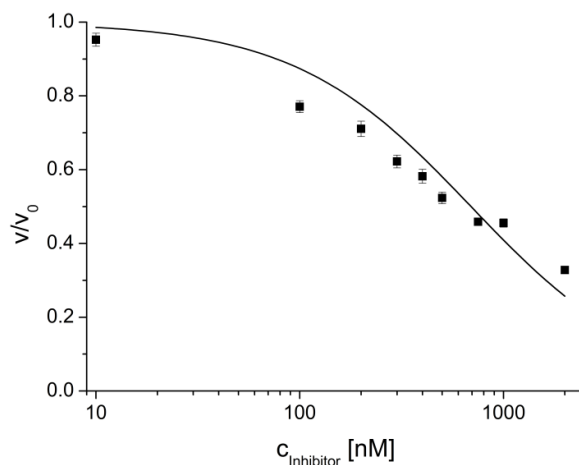


Abb. 4.21: Inhibitionsmessungen des Miniproteins SOTI-III R3 EK4 gegen Rinderpankreas-Trypsin. Die Fehlerbalken wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Für das Miniprotein ergab sich eine Inhibitionskonstante von  $100 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ . Der Wildtyp des Miniproteins weist im Vergleich eine  $K_i$  von  $60 \text{ nM}$  auf. Dies zeigt, dass mit Hilfe der erzeugten Bibliothek eine Selektion neuer Proteaseinhibitoren möglich ist. Da die MCoTI-Bibliotheken im gleichen System erstellt wurden und eine höhere Qualität bezüglich der eingesetzten Gen-Fragmente vorliegt, ist davon auszugehen, dass aus diesen Variantenbibliotheken auch neuartige Inhibitoren isoliert werden können.

#### 4.3.4 Diskussion

Die Klasse der Cystinknoten wurde zuvor bereits als vielversprechende Startmoleküle für Entwicklung hochaffiner und selektiver Bindemoleküle beschrieben.<sup>168,234,235</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Miniprotein EETI Mutationen in mehreren exponierten Schleifen des Moleküls ohne Aktivitätsverlust toleriert.<sup>141</sup> Wie im letzten Abschnitt beschrieben, konnten in dieser Arbeit Variantenbibliotheken auf Basis von MCoTI-II und SOTI-III in *S. cerevisiae* erzeugt und charakterisiert werden (4.3.2). Das Design der Bibliotheken wurde ausgehend von den Strukturen der Cystinknoten erstellt (4.3.1). Im Fall der SOTI-III-Bibliothek wurde ausschließlich die Inhibitorschleife des Miniproteins (zehn Aminosäuren) randomisiert, da zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Studien zum Einfluss von Modifikationen anderer Aminosäurepositionen auf die Faltung und Stabilität des Inhibitors vorlagen. Im Gegensatz dazu wurden im Fall der MCoTI-Bibliothek 17 der 30 Aminosäure-Reste in das Design der Bibliotheken einbezogen (4.3.1.2). Hier wurden neben der Inhibitorschleife auch benachbarte Aminosäurereste und eine N-terminale Schleife des Miniproteins in die Randomisierung eingebunden, da bereits Studien zum Einfluss der Modifikation verschiedener Reste auf die Stabilität des Inhibitors vorlagen.

Für die Erstellung der Bibliotheken wurden Vektor-Fragmente sowie die zu integrierenden Miniproteinvarianten im präparativen Maßstab erzeugt, gereinigt und für

---

die Transformation in *S. cerevisiae* eingesetzt (4.3.2). Gleichzeitig wurden unterschiedliche Synthesestrategien der Gen-Fragmente gewählt. Im Fall der SOTI-III-Bibliothek erfolgte die Randomisierung der ausgewählten Aminosäurepositionen durch Variation der für die Oligonukleotid-Synthese eingesetzten Basen je Position (NNK). Im Fall der MCoTI-II Bibliothek wurde eine Codon-basierte Synthese gewählt. Die MCoTI-Varianten wurden durch die Firma Sloning BioTechnology GmbH (Puchheim) synthetisiert und charakterisiert. Hierbei ergab sich eine hohe Synthesequalität, wobei die erhaltene gewichtete Aminosäureverteilung nur geringfügig von der geplanten differierte (4.3.2.4). Im Fall der MCoTI(SloI)-Bibliothek erfolgte die Charakterisierung durch Sequenzierung (4.3.2.4). In weniger als 0,1 % der funktional vorliegenden Sequenzen treten Stop-Codone auf. Verglichen mit der SOTI-III-Bibliothek, bei der 26 % der Sequenzen ein Stop-Codon enthielten, ist dies ein vernachlässigbar geringer Anteil. Generell wurde nachgewiesen, dass ein hoher Anteil funktionaler sowie unterschiedlicher Sequenzen vorliegt und die Verteilung der randomisierten Aminosäuren nahezu der geplanten (theoretischen) entspricht.

Zum Nachweis der Funktionalität wurde die SOTI-III-Bibliothek nach Trypsin-Bindemolekülen durchmustert (4.3.3). Hier konnte im Verlauf von vier Selektionsrunden eine Population von Hefezellen mittels MACS und FACS angereichert werden, welche durch die Protease markiert wurde. Nach Bindungsstudien und Sequenzierung der Protease-bindenden Einzelklone konnte eine dominante Variante des Miniproteins SOTI-III identifiziert werden (4.3.3.2). Durch Sequenzierung der zweiten und dritten Selektionsrunde mittels 454-Sequenzierung wurde gezeigt, dass der dominante Einzelklon EK4 sich erst nach der dritten Selektionsrunde durchsetzte (4.3.3.3). Im Anschluss konnte nach Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese das Bindemolekül biochemisch charakterisiert werden. Hierbei ergab sich eine Inhibitionskonstante von 100 nM, die nur marginal von der des Wildtyps (61 nM) abweicht (4.3.3.4).

Dies belegt, dass aus den erstellten und charakterisierten Miniproteinvariantenbibliotheken neuartige Proteaseinhibitoren isoliert und charakterisiert werden konnten. Allerdings war die Isolierung einer Variante mit erhöhter Aktivität nicht möglich. Aus den Daten der 454-Sequenzierung ging ebenfalls kein Rückschluss auf bessere Inhibitoren hervor. Somit bleibt offen, ob durch Modifikation der Selektionsbedingungen (z. B. *off-rate selection* oder Verringerung der Proteasekonzentration) bessere Inhibitoren

isoliert werden können. Es ist jedoch ebenso denkbar, dass der Wildtyp des Inhibitors die für diesen *scaffold* höchste Inhibitionskonstante für Trypsin aufweist.

#### 4.4 Isolierung und Charakterisierung neuer Inhibitoren der humanen Matriptase-1 auf Basis von MCoTI-II und SOTI-III

##### 4.4.1 Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung humaner Matriptase-1

Die Expression der katalytischen Domäne der TTSP Matriptase-1 wurde nach Transformation (3.1.4) von *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP mit dem Plasmid pET42dest His-Matriptase (cd) 596-855 wie unter 3.4.1 beschrieben durchgeführt.<sup>81,118,236,237</sup> Die Zellen wurden nach 6 h Induktion mit Hilfe der Heraeus Multifuge 3L-R pelletiert (12 min, 4.000 U/min, 4 °C) in PBS aufgenommen und aufgeschlossen (3.4.2). Die freigesetzten *inclusion bodies* konnten nun durch erneute Zentrifugation (Kühlzentrifuge Sigma 3K30, 30 min, 15.000 g, 4 °C) sedimentiert und mit PBST gewaschen werden. Anschließend wurde das Pellet in Denaturierungspuffer aufgenommen und die verbleibenden Schwebstoffe durch Zentrifugation abgetrennt. Die gelösten *inclusion bodies* wurden dann mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (3.4.10.1) und mittels SDS-Page (3.4.3) wie in Abb. 4.22 A zu sehen analysiert. Wie hier gezeigt, konnten Matriptase-1 *inclusion bodies* aus dem Zelllysats mittels Affinitätschromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden. Die Rückfaltung erfolgte dann bei 4 °C durch zweistufige Dialyse in

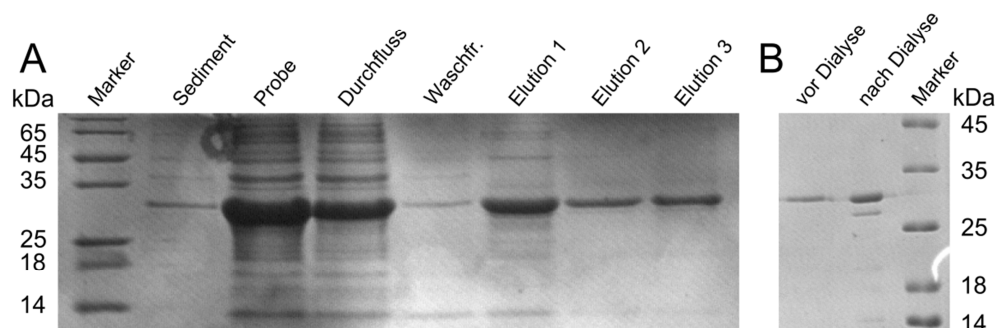


Abb. 4.22: SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen der Reinigung und Rückfaltung der katalytischen Domäne der humanen Matriptase-1 aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP mit dem Expressionsvektor pET42dest His-Matriptase (cd) 596-855. **A:** SDS-PAGE der *inclusion bodie* Reinigung mittels Affinitätschromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen. **B:** SDS-Page der Rückfaltung autokatalytisch aktivierter humaner Matriptase-1 inclusion bodies durch Dialyse. Marker: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. Modifiziert nach Avrutina *et al.*<sup>117,118</sup>

Puffern mit abnehmender Harnstoffkonzentration. Hierfür wurden die Elutionen der IMAC vereinigt und das Volumen mit Elutionspuffer auf 100-150 mL erhöht. Im Anschluss wurde die Probe in 5 L Rückfaltungspuffer I über Nacht dialysiert. Am Folgetag wurde der Puffer zweimal jeweils nach 10 h gegen 5 L Rückfaltungspuffer II ausgetauscht. Wie in Abb. 4.22 B gezeigt, konnten die isolierten *inclusion bodies* mittels Dialyse rückgefaltet werden. Durch die autokatalytische Aktivierung wurde eine N-terminale ca. 3 kDa große Domäne der Protease abgespaltet. Bei der Polyacrylamid-gelelektrophorese ist deshalb eine Bande mit verringerter Größe ein Nachweis für erfolgreiche Rückfaltung, was in Abb. 4.22 B eindeutig zu erkennen ist. In der Probe ausgefallenes Protein sowie andere Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge Sigma 3K30, 30 min, 15000 g, 4 °C) sedimentiert und der Überstand nach Filtration weiter verwendet.

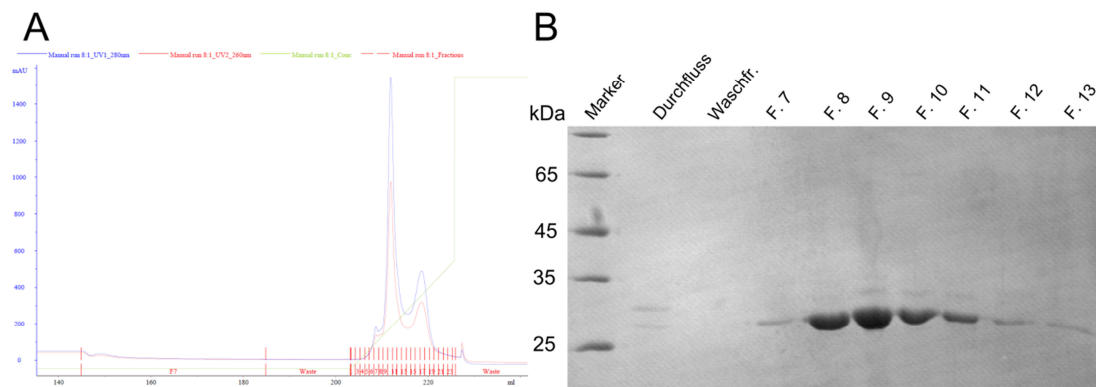


Abb. 4.23: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (A) und SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen (B) nach Rückfaltung der isolierten *inclusion bodies*. Die Elution des Proteins erfolgt durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten. Marker: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. Modifiziert nach Avrutina *et al.*<sup>118</sup>

Im Anschluss wurde die autokatalytisch aktivierte Protease durch eine Anionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt (3.4.10.2, Abb. 4.23 A). Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.4.3) analysiert (Abb. 4.23 B) und Fraktionen, die Matriptase-1 enthielten, auf Proteaseaktivität überprüft und vereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (3.4.5) der Proben konnte durch Titration der aktiven Proteasemoleküle (3.5.1) die Konzentration aktiver in Lösung vorliegender Protease ermittelt werden.

Anhand des durch die Titration ermittelten Fluoreszenzsignals (Abb. 4.24 B) kann mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden des Fluorophors (Abb. 4.24 A) die Konzentration

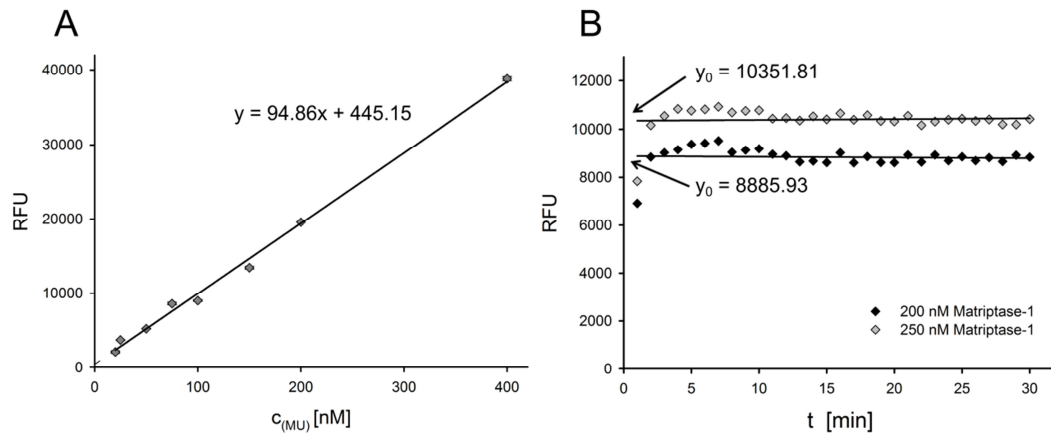


Abb. 4.24: *Active site* Titration humaner Matriptase-1 **A**: Kalibrierungsgerade des Fluorophors 4-Methylumbelliferon **B**: Titration der aktiven Proteasemoleküle humaner Matriptase-1 unter Verwendung von 4-methylumbelliferyl-p-guanidobenzoat (MUGB). Die Abbildung wurde modifiziert nach Avrutina *et al.*<sup>118</sup>

aktiver Proteasemoleküle berechnet werden. Ein Beispiel einer solchen *active site* Titration ist in Abb. 4.24 gegeben. Um ausreichende Mengen der Protease für die Durchmusterung von Miniproteinvariantenbibliotheken und Bestimmung der Inhibitionskonstante zu generieren, wurden die Expression, Rückfaltung und Reinigung humaner Matriptase-1 mehrfach wiederholt.

Für eine weitere Charakterisierung der Protease erfolgte ein Nachweis durch spezifische Antikörper auf einer Nitrozellulosemembran. Das gereinigte Protein wurde

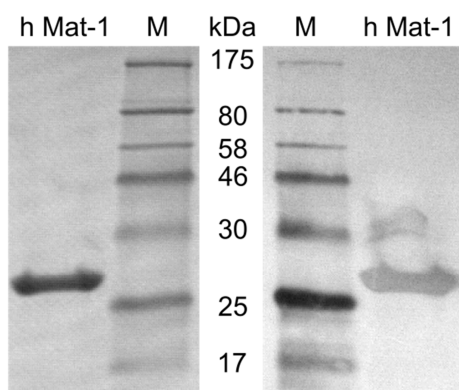


Abb. 4.25: SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts) gereinigter humaner Matriptase-1. Für die spezifische Markierung der Protease wurde der *Anti-ST14 antibody - Catalytic domain* (Abcam) verwendet. M: *Prestained Protein Marker, Broad Range* (7-175 kDa)

hierfür erneut durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.4.3) analysiert und die in der Probe enthaltenen Proteine der Größe entsprechend aufgetrennt. Im Anschluss erfolgten der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und der Nachweis durch einen spezifischen Matriptase-1 Antikörper (*Anti-ST14 antibody - Catalytic domain*, Abcam, 3.4.4). Wie in Abb. 4.25 zu sehen, konnte ein Protein im Polyacrylamidgel mit einer Größe von ca. 26 kDa durch Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau

---

nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte dieses Protein als katalytische Domäne der Typ II transmembranen Serinprotease Matriptase-1 identifiziert werden, da eine Markierung durch den zuvor erwähnten spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte. Das Signal wurde im Größenbereich des im Polyacrylamidgel nachgewiesenen Proteins detektiert. Über der vorliegenden Bande ist eine unspezifische Markierung des *Western Blots* zu sehen. Diese kann jedoch vernachlässigt werden, da kein Protein in diesem Größenbereich durch die SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte.

#### **4.4.2 Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf Matriptase-1**

Für die Isolierung und Charakterisierung neuartiger hochaffiner Inhibitoren der humanen Matriptase-1 wurden in den folgenden Abschnitten die Miniproteinbibliotheken auf Basis von SOTI-III durchmustert.

##### *4.4.2.1 Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek*

Die Durchmusterung der Bibliothek und Identifikation Matriptase-bindender Einzelklone wurde von Stefanie Müller im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Ausgehend von zuvor erzeugten Gefrierkulturen erfolgte die Kultivierung (3.1.5) der Unterbibliotheken in 1 L SDCAA-Medium über Nacht. Nach Ermittlung der Zelldichte der Kultur (3.1.2) wurde für die Induktion der Expression der Fusionsproteine eine Zellzahl, die der zehnfachen Diversität der Unterbibliotheken entsprach, in 500 mL SGCAA-PEG-Medium für ein bis zwei Tage kultiviert (3.1.6). Im Anschluss wurde jede Unterbibliothek auf die Vollängenexpression des auf der Hefeoberfläche zu präsentierenden Fusionsproteins durch Markierung des cMyc-Epitops überprüft. Der Nachweis der Expression erfolgte vor jeder durchgeführten Selektionsrunde. Für eine vergleichbare Interpretation der Messungen wurden nach Bestimmung der Zelldichte (3.1.2) der Kulturen  $10^7$  Hefezellen für die Detektion des Epitops eingesetzt. Im Anschluss wurde jeweils eine Zellzahl der Unterbibliotheken, die dem Zehnfachen ihrer Diversität entsprach, für die erste Selektionsrunde mit zuvor erzeugter biotinylierter Matriptase-1 vereinigt (3.4.7), einfach markiert (3.6.2) und mittels FACS durchmustert.

Die separierte Hefepopulation wurde erneut kultiviert (3.1.5) und induziert (3.1.6). Durch Erstellung serieller Verdünnungsplattierungen auf selektiven Medienplatten konnte im Anschluss die Überlebensrate ermittelt und die Selektion von Klonen mit Plasmid-kodiertem Auxotrophiemarker belegt werden. Parallel wurden Gefrierkulturen für eine langfristige Lagerung der Selektionsrunden erstellt (3.1.5).



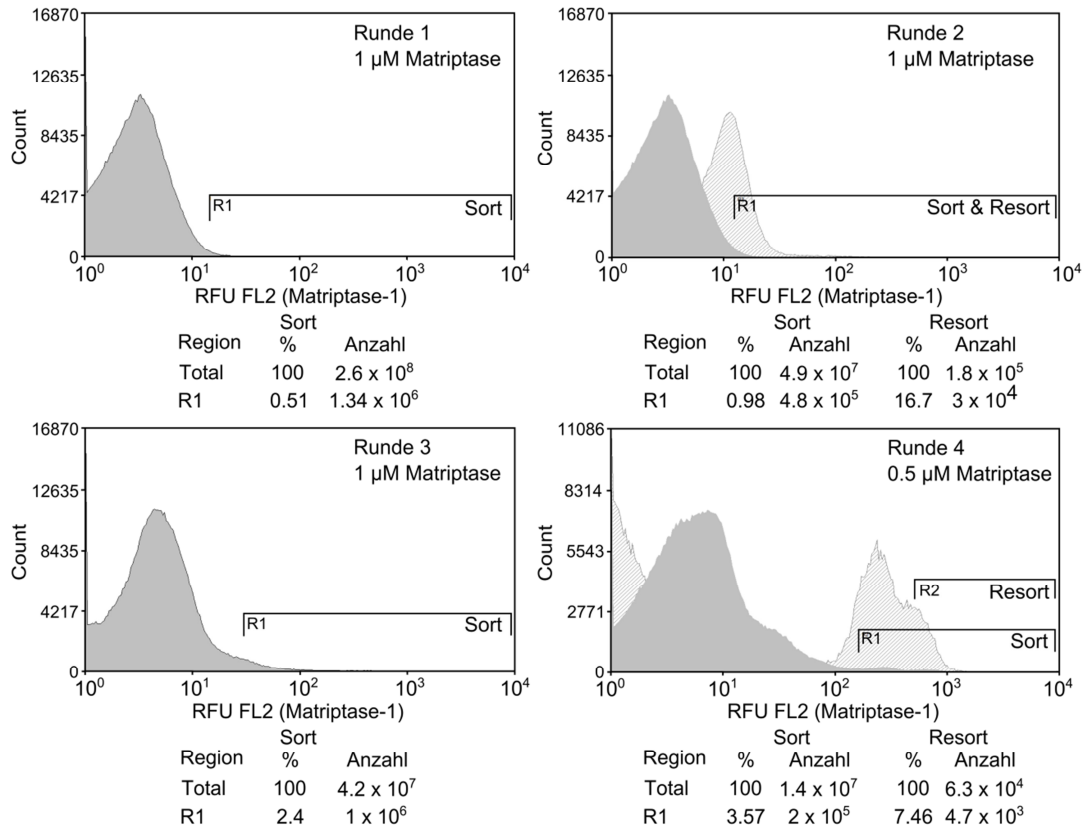


Abb. 4.26: FACS-Histogramme der Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek auf Matriptase-1. Gezeigt sind Histogramme der ersten bis vierten Selektionsrunden. Im Fall von Resortierungen der selektierten Zellen sind diese als Überlagerung in der entsprechenden Runde dargestellt. Die Bereiche der separierten Ereignisse sind durch R1 bzw. R2 im Fall einer Resortierung markiert. Unter den Histogrammen sind die Gesamtzahl sowie die Zahl der aussortierten Ereignisse dargestellt. Die gewählte Konzentration der Protease Matriptase-1 ist für jede Runde in jedem Histogramm oben rechts gezeigt. Die Abszisse beschreibt die logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz (RFU) FL2 der durch SAPE nachgewiesenen biotinylierten Protease. Die Ordinate beschreibt die linear aufgetragene Anzahl (Count) der separierten Ereignisse. Abb. modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>223</sup>

Nach jeder durchgeführten Durchmusterung erfolgten die zuvor beschriebene Rekultivierung sowie Induktion. Insgesamt wurden vier Selektionsrunden durchgeführt. Um die Stringenz der Durchmusterung zu steigern, wurde die für die Markierung eingesetzte Proteasekonzentration im vierten Durchmusterungszyklus von 1  $\mu$ M auf 500 nM reduziert. In Abb. 4.26 sind die Histogramme der Selektionsrunden gezeigt und belegen die Anreicherung einer Hefezellpopulation, die durch Matriptase-1 markiert werden konnte.



#### 4.4.2.2 Bindungsstudie und Sequenzierung selektierter Einzelklone der SOTI-III-Bibliothek

Für die Analyse der Bindungseigenschaften der auf Matriptase-1 selektierten Hefezellen wurden Einzelklone kultiviert (3.1.5) und die Präsentation der Miniproteinvarianten induziert (3.1.6). Gleichzeitig erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA sieben separater Einzelklone aus Hefe (3.2.6) sowie die Amplifikation der Vektoren durch Transformation in *E. coli* (3.1.4). Nach Kultivierung der Bakterien (3.1.3) und erneuter Isolierung der Plasmide (3.2.5.1) erfolgt die Sequenzierung der ausgewählten Klone mit Hilfe des Oligonukleotids pCT-seq-lo durch die Firma Seqlab (Göttingen). Die Analyse der Sequenzen ergab, dass alle isolierten Klone die gleiche Variante des Miniproteins enthielten. Die Sequenz und die durchflusszytometrische Analyse ist in Abb. 4.27 dargestellt. Es fällt auf, dass die Aminosäuresequenz der Inhibitorschleife deutlich von der des Wildtyp-Inhibitors abweicht. Im Vergleich bleiben lediglich Valin 26 und

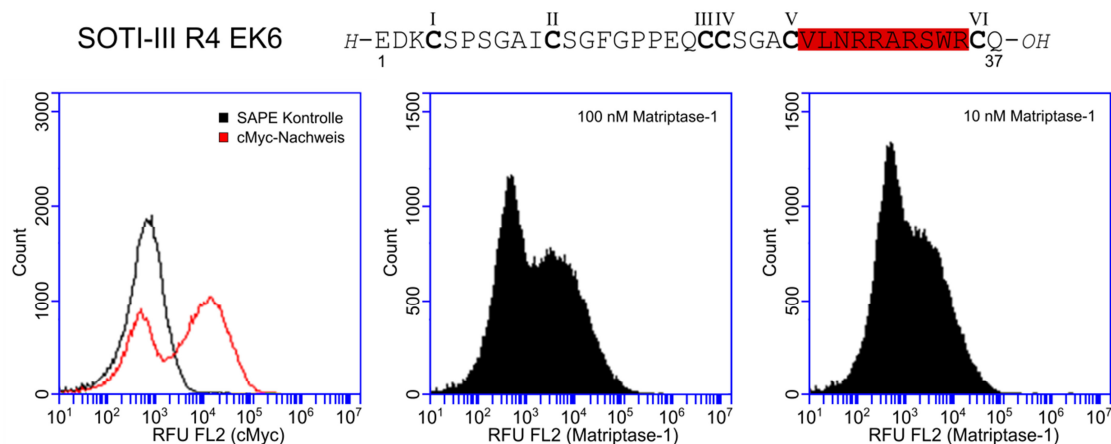


Abb. 4.27: Aminosäuresequenz des auf Matriptase-1 selektierten SOTI-III R4 EK 6 und Histogramme der Bindungsanalyse. Der Bereich der Inhibitorschleife wurde in der Sequenz der SOTI-Variante rot hinterlegt. Der Nachweis der Volllängenpräsentation des Fusionsproteins erfolgte durch Detektion des cMyc-Epitops (unten links). Die Bestätigung der Bindung an Matriptase-1 erfolgte durch Markierung der Zellen mit unterschiedlichen Proteasekonzentrationen (unten mittig sowie rechts). Für jede Messung wurden  $5 \cdot 10^4$  Ereignisse analysiert.

Arginin 32 erhalten. Gegenüber der Ausgangssequenz sind drei zusätzliche Arginine in der Inhibitorschleife vorhanden. Welcher dieser Reste als P<sub>1</sub>-Rest des Inhibitors fungiert und essentiell zur Bindung der Protease beiträgt, ist jedoch unklar. Die Volllängenpräsentation des Fusionsproteins konnte durch Detektion des cMyc-Epitops nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine konzentrationsabhängige Markierung der

---

Hefezellen durch biotinylierte Matriptase-1 gezeigt werden, wobei keine unspezifische Färbung der Hefezellen durch SAPE vorliegt (Abb. 4.27).

Um die für die Bindung essentiellen Arginine zu bestimmen, wurde ein Alanin-Scan der vier in Frage kommenden Reste durchgeführt. Die Integration der Alanin-Mutanten des SOTI-III R4 EK6 in den für die Präsentation benötigten pCT-Vektor erfolgte durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae*. Die zu integrierenden DNA-Fragmente wurden durch PCR (3.3.2) erzeugt. Die Mutationen wurden durch die verwendeten Oligonukleotide eingeführt. Als Matrize wurde die Vektor-DNA des zuvor sequenzierten SOTI-III R4 EK6 eingesetzt.

Die PCR wurden mit einer Annealing-Temperatur von 52 °C und einer Elongationszeit von 30 s mit den Primern SOTI-MatIK3-mod-R1-A-lo, SOTI-MatIK3-mod-R2-A-lo, SOTI-MatIK3-mod-R3-A-lo und SOTI-MatIK3-mod-R4-A-lo durchgeführt. Im Anschluss wurden die PCR-Reaktionen mittels Gelelektrophorese (3.2.3) auf entstandene PCR-Produkte überprüft, die dann isoliert und aufgereinigt wurden (3.2.4). Die Integration der Fragmente in den pCT-Vektor erfolgte durch homologe Rekombination nach Transformation in *S. cerevisiae* (3.1.7) und wurde nach Kultivierung der Hefezellen auf selektiven Agarplatten (3.1.5) via Kolonie-PCR überprüft. Die Vektor-DNA positiver Einzelklone wurde aus Hefe isoliert (3.2.6) und in *E. coli* retransformiert (3.1.4). Nach Amplifikation der Plasmide wurden diese erneut aus *E. coli* isoliert und unter Verwendung des Oligonukleotids pCT-seq-lo durch die Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert.

Einzelklone mit korrekter DNA-Sequenz wurden anschließend für die Bindungsstudien auf der Hefeoberfläche eingesetzt. Hierfür wurden die sequenzierten Einzelklone kultiviert (3.1.5) und die Genexpression durch einen Wechsel des Mediums induziert (3.1.6). Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Vollängenpräsentation des Fusionsproteins auf der Hefeoberfläche durch Markierung des cMyc-Epitops (3.6.1). Erst nach Bestätigung der Vollängenpräsentation wurden die eigentlichen Bindungseigenschaften der Alanin-Mutanten analysiert. Hierfür wurden die Einzelklone in 1 µM biotinylierter Matriptase-1 markiert (3.6.2) und mittels Durchflusszytometrie (3.6.3) analysiert.

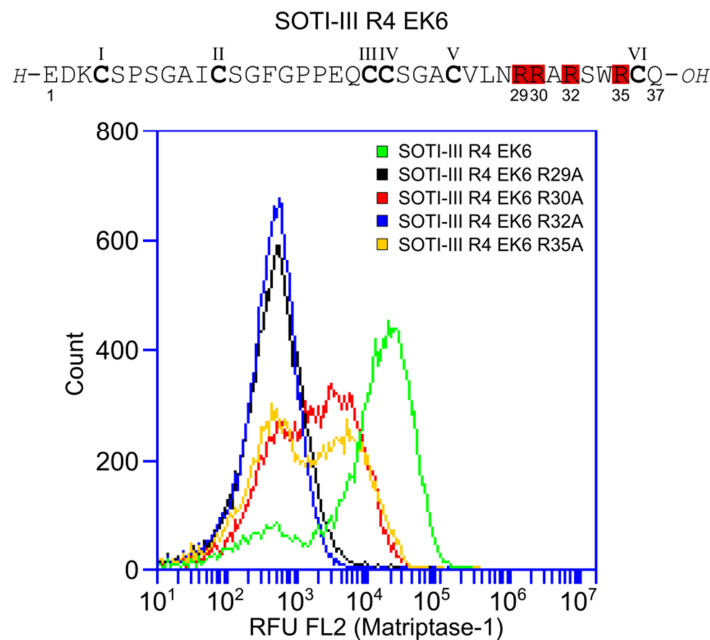


Abb. 4.28: Alanin-Scan des auf Matriptase-1 selektierten Miniproteins SOTI-III R4 EK6. Über dem Histogramm ist die Aminosäuresequenz der SOTI-Variante dargestellt und die durch Alanin ausgetauschten Arginine in Rot hinterlegt. Darunter ist eine Überlagerung der Histogramme der mit Matriptase-1 markierten Mutanten der SOTI-Variante dargestellt. Für die Bindungsstudie mittels Durchflusszytometrie wurden  $1,5 \cdot 10^4$  Ereignisse analysiert. Abb. modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>223</sup>

In Abb. 4.28 sind die Ergebnisse der Bindungsanalyse dargestellt. Durch Markierung der SOTI-III Variante mit einer höheren Konzentration der Protease sollten alle auf der Hefeoberfläche präsentierten Bindemoleküle adressiert werden. Die nicht mutierte Variante R4 EK6 weist dadurch ein stärkeres Fluoreszenzsignal als in Markierungen mit 100 oder 10 nM der Protease auf. Wie in Abb. 4.28 zu sehen ist, liegt bei allen Alanin-Mutanten der Variante 6 eine durch die Mutation verursachte Abnahme der detektierten relativen Fluoreszenz vor. Interessanterweise haben jedoch einige Aminosäureaustausche größeren Einfluss auf die Bindung der Protease als andere. Eine Mutation der Arginin-Reste an Position 30 oder 35 beeinflusst die Bindung von Matriptase-1 wesentlich geringer als ein Austausch der Arginin-Reste an Position 29 oder 32. Hier verursacht die Mutation einen vollständigen Verlust des Signals.

Für den Nachweis der Anreicherung der zuvor analysierten SOTI-III Variante R4 EK6 erfolgte eine Hochdurchsatzsequenzierung der zweiten und dritten Selektionsrunde. Hierfür wurde zunächst die Vektor-DNA der Runden aus Hefe isoliert (3.2.6) und die zu analysierenden Bereiche des Plasmids durch PCR (3.3.2) amplifiziert.

Die PCR wurde mit einer Annealing-Temperatur von 52 °C und einer Elongationszeit von 30 s durchgeführt. Unter Verwendung der Oligonukleotide pct-basic-mid5ca-up und pct-basic-mid10-lang-lo (Tabelle 2.1) im Fall der zweiten Selektionsrunde und der Primer pct-basic-mid6ac-up sowie pcc-basic-lang-mid14gt-lo für die dritte Durchmusterung konnten zusätzlich für die Analyse der Daten notwendige MID-Sequenzen angebracht werden. Anschließend wurde eine emPCR für die Kopplung der PCR-Produkte an einzelne Partikel sowie deren lokale Amplifikationen durchgeführt und dann wie unter 3.2.9 beschrieben weiter verfahren. Nach Verarbeitung der Sequenzdaten konnten 664 Sequenzen der zweiten und 307 der dritten Selektionsrunde in funktionalem Zustand identifiziert werden. Diese wurden für die weitere Auswertung und als Beleg der Anreicherung der SOTI-III Variante R4 EK6 verwendet. Hier fällt auf, dass die zuvor nach vier Selektionsrunden identifizierte SOTI-III Variante EK6 unter den Sequenzen der zweiten Runde nicht vorliegt. In Tabelle 4.4 sind die fünf häufigsten Varianten der jeweiligen Selektionsrunde aufgeführt. Unter den Sequenzen der dritten Durchmusterung tritt R4 EK6 jedoch bereits 49-mal von 307 betrachteten Varianten auf und macht somit fast 16 % aller vorliegenden Sequenzen aus. Nach vier Selektionsrunden stellte diese SOTI-III Variante sieben von sieben zufällig sequenzierten Einzelklonen. Aus den vorliegenden Daten der Sequenzierung kann abgeleitet werden, dass diese Variante angereichert werden konnte und Matriptase-1 bindet. Das

Tabelle 4.4: Auswertung der Sequenzdaten der zweiten und dritten Selektionsrunde der SOTI-III-Bibliothek auf Matriptase-1. Aufgeführt sind die Varianten, deren Häufigkeit und Sequenz. Cystein-Reste sind fett und gelb hinterlegt dargestellt. Die Inhibitorschleife der Miniproteine ist in Grau illustriert.

<b>2. Selektionsrunde der SOTI-III-Bibliothek auf Matriptase-1</b>			
<b>Variante</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>
47	31	4,67	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> SSRRRSERF <b>AC</b> Q
7	28	4,22	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> DIRLNPATT <b>AC</b> Q
56	28	4,22	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VPQWSAPHDG <b>C</b> Q
49	27	4,07	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> SYHSLVWAVG <b>C</b> Q
51	25	3,77	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> TLSVRTLVP <b>EC</b> Q
<b>3. Selektionsrunde der SOTI-III-Bibliothek auf Matriptase-1</b>			
<b>Variante</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>
37	49	15,96	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> VLNRRAR <b>SWRC</b> Q
2	26	8,47	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> ALLVKLALLD <b>C</b> Q
40	26	8,47	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> WNNTGLCCPRG <b>C</b> Q
21	25	8,14	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> PLATYRIGAP <b>C</b> Q
4	22	7,17	EDK <b>C</b> SPSGAI <b>C</b> SGFGPPEQ <b>CC</b> SGA <b>C</b> DSDESHGEAP <b>C</b> Q

---

Verringern der Protease-Konzentration während der vierten Selektionsrunde könnte zusätzlich eine Anreicherung der SOTI-III Variante 6 begünstigt haben.

#### **4.4.3 Durchmusterung der MCoTI-II Bibliothek auf Matriptase-1**

##### *4.4.3.1 Durchmusterung der MCoTI(SloI)-Bibliothek*

Die Selektion von Bindemolekülen der Protease Matriptase-1 aus der MCoTI(SloI)-Bibliothek erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS). Hierfür musste die Bibliothek ausgehend von einer Gefrierkultur kultiviert (3.1.5) und anschließend die Oberflächenpräsentation der Miniproteinvarianten induziert werden (3.1.6). Die primäre Kultivierung wurde in 1 L Medium durchgeführt, wohingegen die Induktion der Bibliothek in 500 mL Medium erfolgte. Vor jeder Selektionsrunde erfolgte der Nachweis der Präsentation des Fusionsproteins durch Detektion des cMyc-Epitops (3.6.1). Konnte das Epitop auf der Hefeoberfläche nachgewiesen werden, erfolgte eine Doppelmarkierung von  $2 \cdot 10^8$  Zellen (3.6.1, 3.6.2). Die Markierung mit biotinylierter Matriptase-1 wurde zeitgleich mit dem erneuten Nachweis des cMyc-Epitops durchgeführt. Nach Selektion von Hefezellen, die sowohl durch Protease als auch cMyc-Antikörper markiert werden konnten, erfolgte eine erneute Kultivierung (3.1.5) und Induktion der Proteinexpression (3.1.6).

Durch das Anfertigen serieller Verdünnungsplattierungen auf selektiven Medienplatten konnte die Überlebensrate ermittelt werden. Insgesamt wurden vier Selektionsrunden *via* FACS durchgeführt (3.6.3) und wenn möglich eine Zellzahl, die der zehnfachen Diversität der Bibliothek oder Runde entsprach, sortiert. Zusätzlich wurde die für die Doppelmarkierung eingesetzte Konzentration an Matriptase-1 mit zunehmender Anzahl der Durchmusterungen reduziert. Dieses Vorgehen sollte den Selektionsdruck während der Sortierungen erhöhen und das Anreichern hochaffiner Bindemoleküle auf Basis von MCoTI-II begünstigen.

Wie in Abb. 4.29 dargestellt, wurden im Verlauf von vier Selektionsrunden Hefezellen angereichert, die durch biotinylierte Matriptase-1 markiert werden konnten. Trotz abnehmender Proteasekonzentration und stringenterer Sortierbereiche im Verlauf der vier Durchmusterungen zeichnen sich in der vierten Runde nach Markierung mit 10 nM Matriptase-1 deutliche, durch die Protease markierte Hefezellpopulationen ab. Dies deutet auf eine Anreicherung während der Sortierung hin.

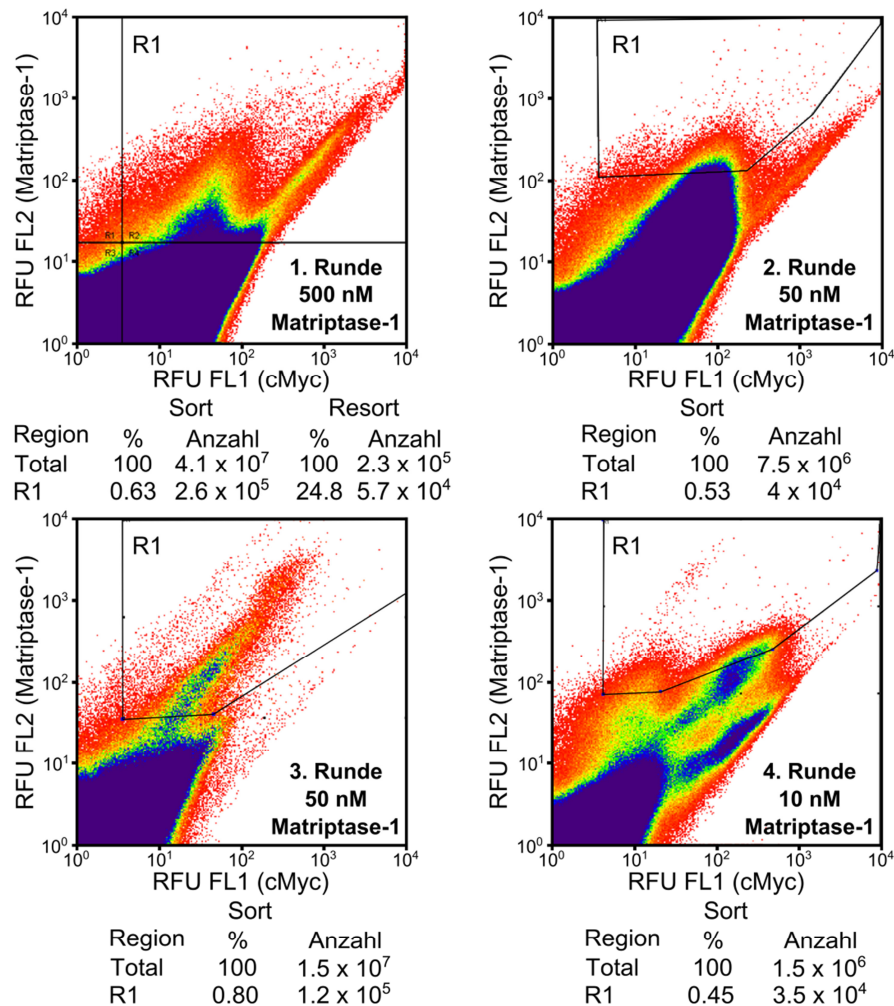


Abb. 4.29: FACS-Dotplots der Durchmusterung der MCoTI(SloI)-Bibliothek auf Matriptase-1. Gezeigt sind die erste bis vierte Selektionsrunde (von links oben nach rechts unten). Für die Selektion erfolgte eine zwei-Farben Markierung der induzierten Hefebibliothek. R1 beschreibt in allen Histogrammen die Region der separierten Zellen. In den Histogrammen indiziert der Farbwechsel von Rot zu Blau eine Zunahme der Zellzahl in dem entsprechenden Bereich. Unter den Histogrammen sind die Gesamtzahl sowie die Zahl der aussortierten Ereignisse dargestellt. Die gewählte Proteasekonzentration je Runde ist in jedem Histogramm unten rechts beschrieben. Die Abszisse zeigt die logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz (RFU) FL1 eines FITC-gekoppelten Antikörpers, durch den ein cMyc-spezifischer Antikörper nachgewiesen wird. Die Ordinate beschreibt die logarithmisch aufgetragene RFU FL2 des SAPE-Konjugats, durch das die biotinylierte Protease detektiert wird. Abb. modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>223</sup>

#### 4.4.3.2 Bindungsstudien und Sequenzierungen ausgewählter auf Matriptase-1 selektierter Einzelklone der MCoTI(SloI)-Bibliothek

Ausgehend von Verdünnungsplattierungen der Selektionsrunden wurden Einzelklone zufällig ausgewählt und auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Hierfür wurden die Einzelklone in 2 mL Medium kultiviert (3.1.5) und anschließend die Oberflächenpräsentation der MCoTI-Varianten induziert (3.1.6). Für eine Studie der Bindungseigenschaften der ausgewählten Einzelklone wurde eine Doppelmarkierung der Hefezellen durchgeführt (3.6.2). Die Färbungen wurden dann mittels Durchflusszytometrie analysiert und der Median des Fluoreszenzsignals der Matriptase-1-Markierung verglichen. In Abb. 4.30 ist die Auftragung der Medianfluoreszenz der ausgewählten Einzelklone dargestellt. Bei allen hier dargestellten Einzelklonen konnte durch einen cMyc-Antikörper das vollständige Fusionsprotein auf der Oberfläche der Hefezellen nachgewiesen werden. Einzelklone zwei, fünf und neun der dritten sowie Klon eins, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht und zehn der vierten Selektionsrunde weisen eine starkes Signal der Proteasemarkierung auf. Aus den vorliegenden Daten kann man ableiten, dass die Anzahl von MCoTI-Varianten mit deutlichem Fluoreszenzsignal von der dritten zur vierten Runde zunimmt. Der Wildtyp des Miniproteins weist im Vergleich zu den selektierten Varianten ein wesentlich niedrigeres Signal der Matriptasemarkierung auf (Abb. 4.30). Im Folgenden wurde die Vektor-DNA der Einzelklone eins, zwei, fünf, acht und neun der

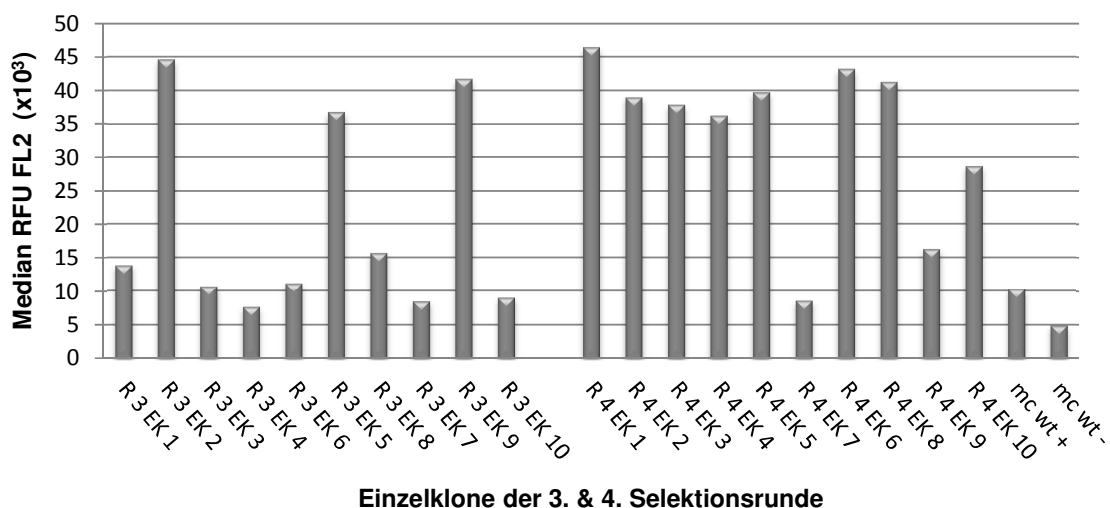


Abb. 4.30: Vergleich der Median Fluoreszenz verschiedener mit Matriptase-1 markierter MCoTI-Varianten. Einzelklone der dritten und vierten Selektionsrunde wurden hierfür mit Matriptase-1 und einem cMyc-spezifischen Antikörper markiert. Für die Auftragung wurden  $2 \cdot 10^4$  Ereignisse mittels Durchflusszytometrie analysiert und auf das Signal der Medianfluoreszenz der Proteasemarkierung betrachtet.



dritten sowie eins, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht und zehn der vierten Selektionsrunde aus *S. cerevisiae* isoliert (3.2.6). Durch eine Transformation der Plasmide in *E. coli* DH5 $\alpha$  (3.1.4) und erneuter Kultivierung (3.1.3) erfolgte die Amplifikation der in Hefe als *single copy* vorliegenden Vektoren. Nach erneuter Isolierung der Vektor-DNA aus *E. coli* (3.2.5.1) erfolgte die Sequenzierung der Plasmide mit Hilfe des Oligonukleotids pCT-seq-lo durch die Firma Seqlab (Göttingen).

In Abb. 4.31 sind die Aminosäuresequenzen der ausgewählten Einzelklone der dritten und vierten Durchmusterungsrunde dargestellt. Das wiederholte Auftreten von einzelnen MCoTI-Varianten zeigt, dass bestimmte Varianten angereichert werden konnten. Insgesamt wurden nur 13 Varianten sequenziert, wovon alle Einzelklone der dritten auch unter den Sequenzen der vierten Runde vorlagen. Alle isolierten Einzelklone weisen Mutationen im Bereich der Inhibitorschleife sowie den benachbarten Regionen auf. In vier der 13 analysierten Sequenzen treten sogar Aminosäureaustausche im Bereich der C-terminalen Schleife auf, die nur zu 10 % mit allen natürlich vorkommenden Aminosäuren außer Cystein randomisiert wurde. Des Weiteren zeichnet sich ein Sequenzmotiv im Bereich der Inhibitorschleife ab, das von der dritten zur vierten Runde bestätigt wird und sich nur minimal ändert. So liegt an

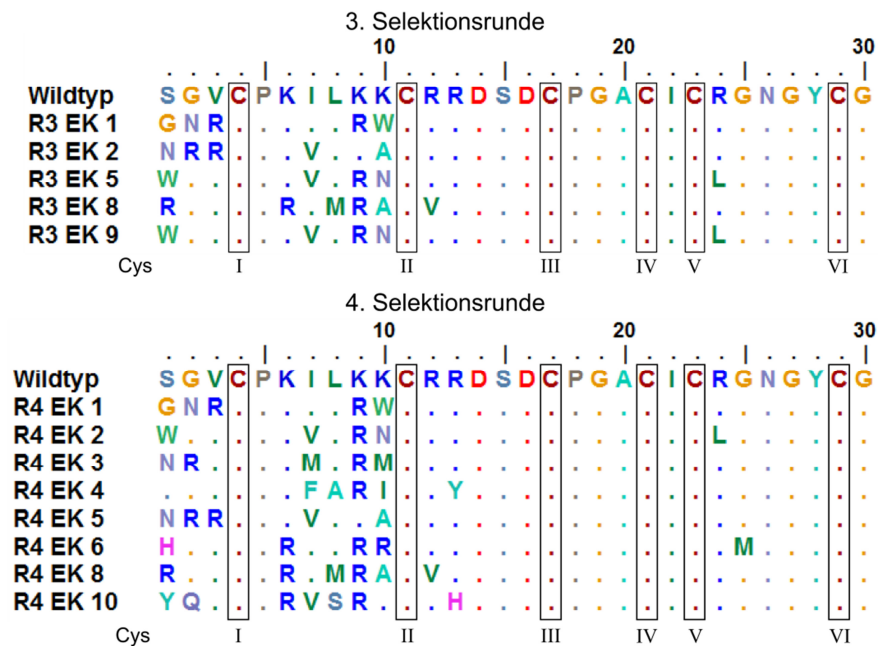


Abb. 4.31: Aminosäuresequenzen der auf Matriptase-1 isolierten MCoTI-Varianten im Vergleich zum MCoTI-II Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp Aminosäuren an. Die Cysteine I bis VI sind zusätzlich umrahmt. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von BioEdit erstellt.



---

Position sechs in Runde vier fast zu gleichen Teilen ein Arginin oder Lysin vor. Diesem Rest folgen in fast allen Fällen zwei hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin, Valin, Methionin oder Alanin. An Position neun liegt bis auf einen Klon der dritten und vierten Runde ein Arginin vor. Somit lässt sich das Sequenzmotiv -R/KXXR- ableiten, wobei X für eine hydrophobe Aminosäure steht. Alle anderen flankierenden Bereiche weisen ebenfalls Mutationen auf. Hier können jedoch keine eindeutigen Sequenzmotive abgeleitet werden. Abb. 4.31 zeigt außerdem, dass Einzelklon zwei der vierten Runde zweimal in der dritten und einmal in der vierten Runde vorliegt und andere Klone ebenfalls beiden Runden auftreten. Parallel zu dieser Selektion wurde eine Durchmusterung der MCoTI(SloI)-Bibliothek auf Matriptase-1 von Michael Tomaszowski durchgeführt. Basierend auf den zusätzlichen Sequenzanalysen der dritten und vierten Runde dieser Selektion konnte die Anreicherung zuvor erwähnter Einzelklone belegt werden.<sup>223</sup> Ausgehend davon wurden die Einzelklone zwei und fünf der dritten Selektionsrunde für eine weitere biochemische Charakterisierung ausgewählt.

#### **4.4.4 Synthese und biochemische Charakterisierung selektierter Matriptase-1 Inhibitoren**

Aus den Durchmusterungen der SOTI-III sowie MCoTI(SloI)-Bibliothek auf Matriptase-1 gingen mehrere Bindemoleküle der Protease hervor. Aufgrund multipler Anreicherung verschiedener Varianten der Miniproteine wurden die SOTI-III Variante R4 EK6 (Abb. 4.27, Tabelle 4.4) sowie die MCoTI-II Varianten EK2 und EK5 der dritten Selektionsrunde (Abb. 4.31) für eine weitere biochemische Charakterisierung ausgewählt.

#### 4.4.4.1 Synthese, Faltung und Reinigung ausgewählter Matriptasebinder

Für eine weitere Charakterisierung der Bindemoleküle wurden diese zunächst durch mikrowellengestützten SPPS synthetisiert. Alle in diesem Abschnitt beschriebenen

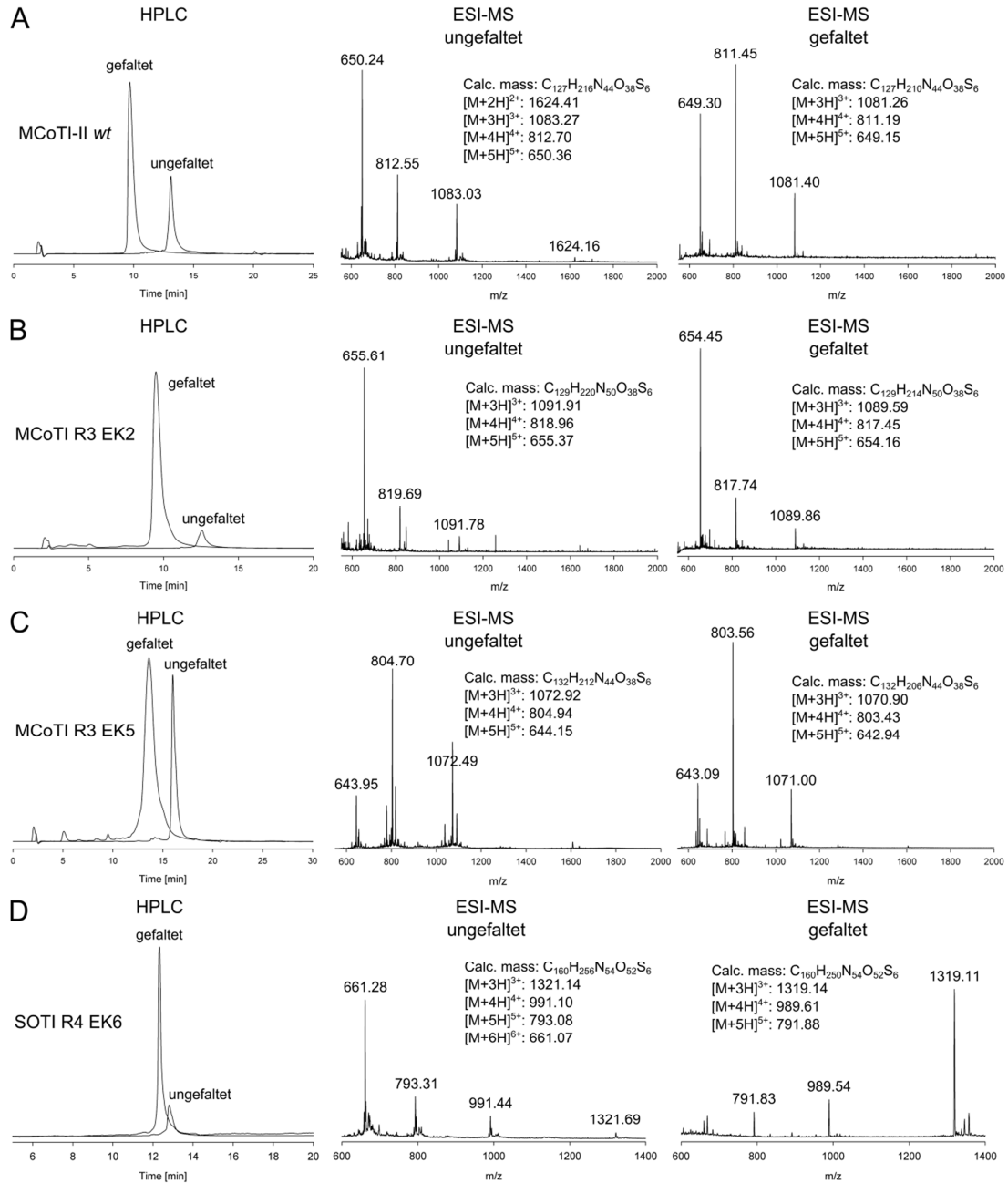


Abb. 4.32: Synthese, oxidative Faltung und Analyse der Miniproteine MCoTI-II *wt* (A), MCoTI R3 EK2 (B), MCoTI R3 EK5 (C) und SOTI R4 EK6 (D). Von links nach rechts ist der HPLC-Verlauf der linearen Vorstufe sowie des gefalteten Peptids bei 220 nm, die massenspektrometrische Analyse des ungefalteten und des gefalteten Miniproteins dargestellt. Abbildungen wurden modifiziert nach Glotzbach *et al.* sowie Reinwarth *et al.*<sup>181,223</sup>

Miniproteine wurden durch Dipl.-Ing. Michael Reinwarth synthetisiert, gefaltet und aufgereinigt. Die linearen Vorstufen der Bindemoleküle wurden wie unter 3.4.8 erzeugt und das Syntheseprodukt mittels HPLC (3.4.10.4) sowie LC-MS (3.4.11) verifiziert. Anschließend konnte das lineare Peptid für die oxidative Faltung unter wässrigen Bedingungen (3.4.9) eingesetzt werden. Die erfolgreiche Oxidation der Moleküle wurde erneut durch HPLC (3.4.10.4) sowie LC-MS (3.4.11) überprüft. In Abb. 4.32 sind die Synthesedaten der ausgewählten Moleküle zusammengefasst.

Die Wildtypmoleküle der Inhibitoren wurden für einen besseren Vergleich parallel oder bereits zuvor synthetisiert. Im Anschluss konnten die oxidierten Peptide im präparativen Maßstab durch HPLC isoliert (3.4.10.4) und für die langfristige Lagerung lyophilisiert werden (3.4.12). Die Ausbeuten beliefen sich im Fall der hier synthetisierten Miniproteine auf 14 – 22 % bezogen auf die synthetisierten linearen Peptidvorstufen.<sup>181</sup>

#### 4.4.4.2 Biochemische Charakterisierung der isolierten Inhibitoren

Im Folgenden Abschnitt wird die Charakterisierung der zuvor synthetisierten Miniproteine beschrieben. Bevor die apparente Inhibitionskonstante ( $K_i^{app}$ ) der vorliegenden Inhibitoren bestimmt werden konnte, wurde die Konzentration der aktiv in Lösung vorliegenden Protease mittels *active site* Titration (3.5.1) ermittelt. Ausgehend von dieser Konzentration wurde anschließend der Anteil von aktiv in Lösung

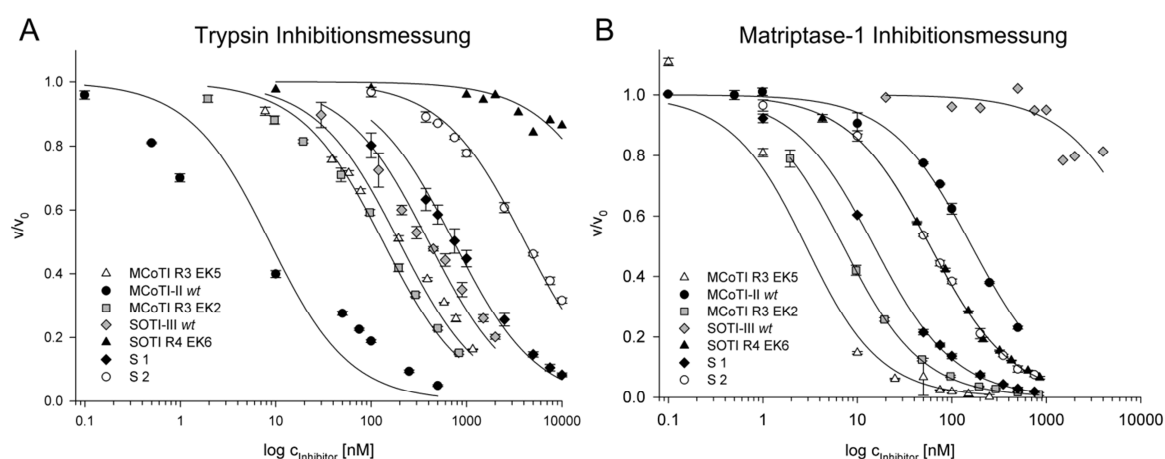


Abb. 4.33: Inhibitionsmessungen verschiedener Proteaseinhibitoren gegen Trypsin (A) und Matriptase-1 (B).<sup>223</sup> Fehlerbalken wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Im Fall der Miniproteine SOTI R4 EK6 gegen Trypsin und SOTI-III wt gegen Matriptase-1 wurden Einfachbestimmungen durchgeführt. S 1 und S 2 sind Referenzsubstanzen<sup>98</sup> (Abb. 4.34).

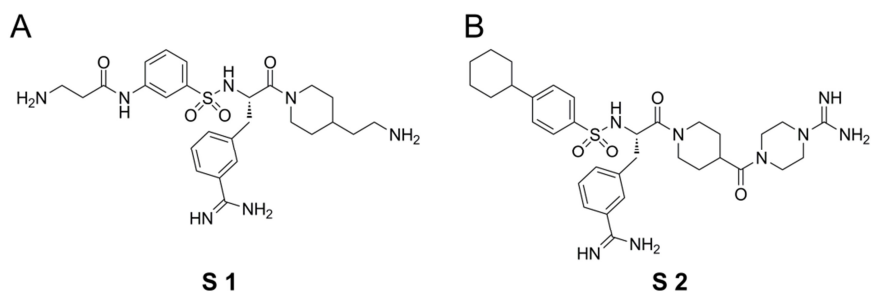


Abb. 4.34: Strukturformeln der als Referenzsubstanzen verwendeten niedermolekularen Matriptase-1 Inhibitoren.<sup>237</sup>

vorliegendem Inhibitor (3.5.2) bestimmt und mit Hilfe des Korrekturfaktors die Konzentration des in Lösung vorliegenden Inhibitors angepasst.

Basierend auf den ermittelten Konzentrationen der aktiven Protease und Inhibitormoleküle wurden anschließend Enzymkinetiken durchgeführt. Anhand der normalisierten Umsatzgeschwindigkeiten der Enzyme in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen wurde dann die  $K_i^{app}$  der Inhibitoren wie unter 3.5.3 beschrieben ermittelt. Zunächst wurden alle zuvor synthetisierten Inhibitoren auf Trypsin und Matriptase-1 vermessen. Die sich ergebenden Kurven der Inhibitionsmessungen sind in Abb. 4.33 dargestellt. Als Referenzsubstanzen wurden parallel zwei niedermolekulare Matriptase-1 Inhibitoren vermessen (Abb. 4.34). Diese wurden zuvor durch Steinmetzer *et al.* beschrieben und publiziert.<sup>237</sup>

Beide Substanzen (S 1 und S 2) weisen nanomolare Inhibitionskonstanten für Matriptase-1 auf (Tabelle 4.5). Basierend auf den ermittelten substratabhängigen Inhibitionskonstanten ( $K_i^{app}$ ) konnten mit Hilfe der Michaelis-Menten Konstanten der Proteasen Trypsin und Matriptase-1 für das Substrat Boc-QAR-pNA die substratunabhängigen

Tabelle 4.5: Inhibitionskonstanten verschiedener Inhibitoren für Trypsin und Matriptase-1

	Trypsin		Matriptase-1	
	$K_i^{app}$ [nM]	$K_i$ [nM]	$K_i^{app}$ [nM]	$K_i$ [nM]
SOTI-III wt	424 ± 23	61 ± 8,4	> 10.000	> 1.000
SOTI R4 EK6	> 10.000	> 1.000	60 ± 0,4	29 ± 3,5
MCoTI-II wt	17 ± 6	2,4 ± 1,0	166 ± 4,4	81 ± 10
MCoTI R3 EK2	134 ± 10	19 ± 2,8	6,9 ± 0,2	3,3 ± 0,4
MCoTI R3 EK5	250 ± 9,4	36 ± 4,7	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1
S 1	734 ± 46	105 ± 15	15 ± 0,1	7,1 ± 0,9
S 2	4.090 ± 170	585 ± 76	58 ± 0,8	28 ± 3,4

Inhibitionskonstanten ( $K_i$ , Tabelle 4.5) berechnet werden.<sup>118</sup> Die sich ergebenden Inhibitionskonstanten sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Aus den Daten geht hervor, dass Inhibitoren mit niedernanomolaren Inhibitionskonstanten für Matriptase-1 isoliert und chemisch synthetisiert werden konnten. Auf Basis des Miniproteins SOTI-III konnte eine SOTI-Variante (R4 EK6) mit einer  $K_i$  von 29 nM identifiziert werden. Im Vergleich zum Wildtyp des Cystinknotens, der keine Bioaktivität gegenüber Matriptase-1 zeigt und eine  $K_i$  von 61 nM für Trypsin aufweist, ist die Spezifität invertiert. Die MCoTI-basierten Varianten 2 und 5 der dritten Selektionsrunde weisen eine  $K_i$  von 3,3 nM und 0,83 nM auf und stellen somit potente Inhibitoren der Protease Matriptase-1 da. Im Vergleich zum Wildtyp des Miniproteins konnte die Inhibition der Protease essentiell verbessert werden. Im Gegensatz dazu verschlechterte sich die Aktivität in Bezug auf Trypsin von 2,3 auf 35,8 nM im Fall des Einzelklons 5. Die Variante 2 der MCoTI-Inhibitoren weist demgegenüber eine zweifach schlechtere  $K_i$  für Trypsin auf. Die ermittelten Inhibitionskonstanten der Referenzsubstanzen entsprechen den zuvor von Steinmetzer *et al.* publizierten Werten<sup>237</sup> und zeigen somit, dass mit Hilfe des genutzten Versuchsaufbaus reproduzierbare Inhibitionsmessungen und Inhibitionskonstanten ermittelt werden können.

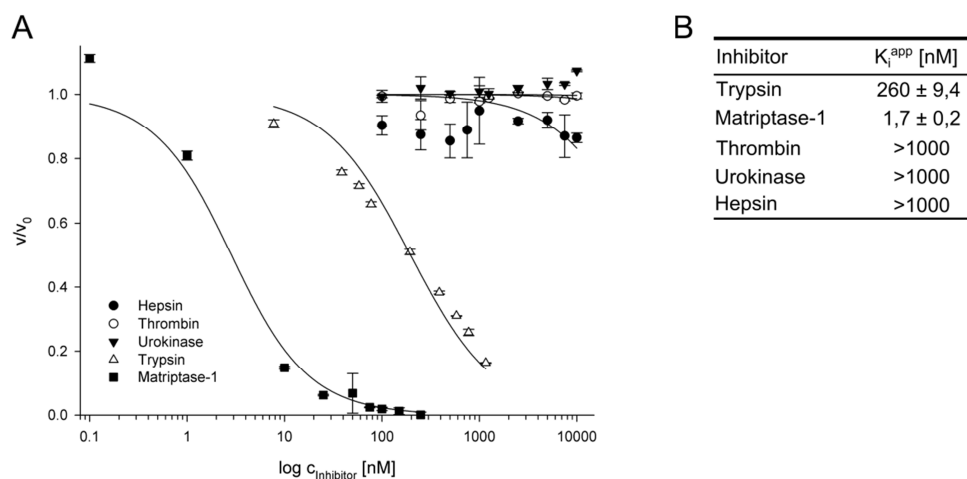


Abb. 4.35: Inhibitionsmessungen der MCoTI-Variante R3 EK5 mit verschiedenen Proteasen. **A**: Inhibitionskurven. **B**: Ermittelte apparente Inhibitionskonstanten des Miniproteins für die jeweiligen Enzyme.

Um die Spezifität des besten Matriptase-1 Inhibitors (MCoTI R3 EK5) zu analysieren wurden weitere Inhibitionsmessungen mit den Proteasen Hepsin, Thrombin und Urokinase (uPA) durchgeführt (3.5.3). In Abb. 4.35 sind die Inhibitionsmessungen dargestellt

und zeigen, dass außer Matriptase-1 lediglich Trypsin adressiert wird. Für alle weiteren Proteasen liegen  $K_i^{\text{app}}$ -Werte  $>1.000$  nM vor. Somit weist der isolierte Inhibitor eine hohe Spezifität sowie Affinität auf.

#### 4.4.4.3 Dosis-Wirkungs-Studie ausgewählter Matriptase-1 Inhibitoren auf humanen Pankreaskrebszellen

Für den Nachweis der Bioaktivität ausgewählter Inhibitoren wurden Dosis-Wirkungs-Studien in Zellkultur durchgeführt. Matriptase-1 exprimierende humane Prostatakrebszellen (PC-3) wurden für diese Studie kultiviert (3.7.1) und für eine langfristige Lagerung Gefrierkulturen erstellt (3.7.3). Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach Abschaben und Resuspendieren der Zellen in PBS mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (3.7.2). Im Anschluss erfolgte die  $IC_{50}$ -Bestimmung entsprechend der unter 3.7.4 beschriebenen Methode, wobei der uPA-spezifische Substratumsatz analysiert wurde. Als Inhibitoren wurden die potentesten auf SOTI- und MCoTI-basierten Matriptase-1 Inhibitoren sowie eine Referenzsubstanz (S 1, Abb. 4.34) ausgewählt. Als zusätzliche Kontrolle wurde außerdem SOTI-III wt vermessen, da dieser Cystinknoten keine Bioaktivität gegenüber Matriptase-1 aufweist.

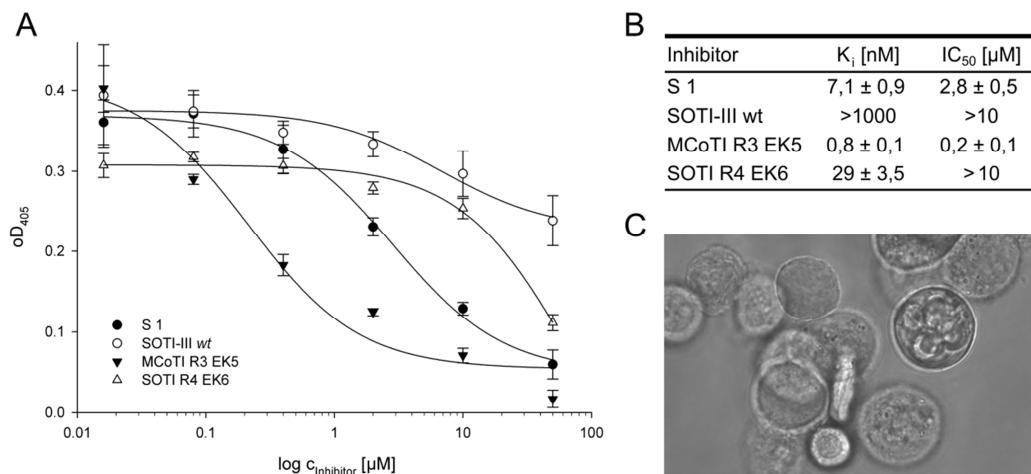


Abb. 4.36: Dosis-Wirkungs-Studie verschiedener Inhibitoren auf PC-3 Zellen. **A:** uPA-Substratumsatz nach 12 h (Zellkultur) in Anwesenheit unterschiedlicher Proteaseinhibitoren. **B:** Gegenüberstellung  $IC_{50}$  und  $K_i$  der analysierten Inhibitoren. **C:** Mikroskopische Durchlichtaufnahme der für den Versuch eingesetzten PC-3 Zellen. Abb. modifiziert nach Glotzbach *et al.*<sup>223</sup>

Somit sollte im Fall dieses Kontrollmoleküls keine Inhibition der uPA-Aktivierung durch Matriptase-1 beobachtet werden. Die Versuchsergebnisse der Dosis-Wirkungs-Studie sind in Abb. 4.36 zusammengefasst. Aus den Graphen ist eindeutig abzuleiten, dass der

---

MCoTI-basierte Inhibitor die höchste Aktivität im Vergleich zu den analysierten Molekülen aufweist (Abb. 4.36 A). Die dargestellten Absorptionssignale nehmen mit zunehmender InhibitorKonzentration ab, was auf eine verringerte Pro-uPA Aktivierung durch Inhibition der Protease Matriptase-1 hinweist. Aus den erhaltenen Daten wurden  $IC_{50}$ -Werte von 210 nM für die MCoTI-Variante R3 EK5 und 2,8  $\mu$ M für die Referenzsubstanz S 1 (Abb. 4.36 B) berechnet. Für die SOTI-Varianten ergeben sich Werte > 10  $\mu$ M, was auf eine sehr geringe oder keine Aktivität in Zellkultur hinweist. Diese Beobachtung korreliert mit den zuvor ermittelten Inhibitionskonstanten. Der schlechteste Matriptase-1 Inhibitor weist nahezu keine Aktivität im Zellversuch auf, wohingegen für den Besten die stärkste Inhibition der Pro-uPA Aktivierung zu verzeichnen ist (Abb. 4.36).

---

#### 4.4.5 Diskussion

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die katalytische Domäne der Typ II transmembrane Serinprotease Matriptase-1 in Form von *inclusion bodies* in *E. Coli* BL21-CodonPlus(DE3) exprimiert und aufgereinigt (Abb. 4.22). Durch Dialyse konnte das denaturiert vorliegende Protein rückgefaltet und im Anschluss die aktiv vorliegende Protease mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden (Abb. 4.23). Die Effizienz der Rückfaltung wurde durch Verdünnen der Proteinlösung vor der Dialyse (1:10) essentiell verbessert. Die Konzentration der aktiv in Lösung vorliegenden Protease konnte mittels *active site* Titration belegt und bestimmt werden (Abb. 4.24). Zusätzlich erfolgte ein spezifischer Nachweis der erzeugten Protease durch *Western Blot* (Abb. 4.25).

Anschließend wurden die unter 4.3 erzeugten Miniproteinvariantenbibliotheken auf Bindemoleküle der erzeugten und charakterisierten Protease durchmustert. In ersten Studien konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe des durch Boder und Wittrup entwickelten Verfahrens zur Oberflächenpräsentation auf *S. cerevisiae* Miniproteinvariantenbibliotheken zielführend auf neuartige Bindemoleküle isoliert werden konnten.<sup>140,238</sup> Innerhalb von vier Selektionsrunden wurden aus beiden Bibliotheken Miniproteinvarianten selektiert, die durch die biotinylierte Protease markiert werden konnten (4.4.2, 4.4.3). Durch Bindungsanalysen zufällig ausgewählter Einzelklone und anschließender Sequenzanalyse lag im Fall der SOTI-Bibliothek ausschließlich eine dominante Variante des Miniproteins vor (Abb. 4.27). Im Bereich der Inhibitorschleife konnte eine neuartige Aminosäuresequenz mit vier darin vorliegenden Argininen identifiziert werden. Das in der Inhibitorschleife nachgewiesene Sequenzmotiv -RRAR- ist ähnlich zu der Konsensussequenz verschiedener Matriptase-1-Substrate und dem außerordentlich affinen peptidischen Inhibitor *H-R-Q-A-R-Bt*.<sup>27,118,239</sup> Sanger- und 454-Sequenzierungen zeigten, dass die isolierte Population nahezu ausschließlich aus dieser Variante bestand (Tabelle 4.4).

Um die für die Bindung essentiellen Arginine in der Inhibitorschleife zu identifizieren, wurde ein Alaninscan durchgeführt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass R29 und R32 essentiell für die Bindung der Protease sind (Abb. 4.28). Im Gegensatz dazu wird durch Mutation der Reste R30 und R35 die Interaktion nur gering beeinflusst. Da die Variante Matriptase-1 inhibiert ( $K_i = 29 \text{ nM}$ , Tabelle 4.5) ist es wahrscheinlich, dass einer der beiden Reste (R29/R32) als  $P_1$ -Rest fungiert.



---

Parallel zu der Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek erfolgte eine Selektion von Bindemolekülen der Protease aus der MCoTI(SloI)-Bibliothek. Während der Selektionsrunden wurde die Konzentration der für die Markierung eingesetzten Protease um das 50-fache (von 500 auf 10 nM) verringert und die Bereiche der zu sortierenden Ereignisse unter 0,8 % gewählt (Abb. 4.29). Trotz dieses hohen Selektionsdrucks konnte eine Population Matriptase-1-bindender Hefezellen angereichert werden.

Im Gegensatz dazu erfolgte die Durchmusterung der SOTI-III-Bibliothek unter weniger stringenten Bedingungen. Hier wurde lediglich in der letzten Selektionsrunde die Proteasekonzentration von 1  $\mu$ M auf 500 nM verringert (Abb. 4.26) und eine wesentlich höhere Zellzahl in der ersten Runde betrachtet. Die Sequenzanalyse der aus der MCoTI(SloI)-Bibliothek angereicherten Klone ergab in Gegensatz zur SOTI-III-Selektion eine Anreicherung verschiedener Miniprotein-Varianten. Trotz höherer Stringenz der Durchmusterungsbedingungen konnte eine Population unterschiedlicher Varianten separiert werden. Dies legt eine höhere Qualität der MCoTI(SloI)-Bibliothek nahe. Zuvor konnte dies bereits mittels Hochdurchsatzsequenzierung belegt werden (4.3). Damit ist festzuhalten, dass aus beiden Bibliotheken Bindemoleküle der humanen Matriptase-1 angereichert werden konnte.

Aus den vorliegenden Sequenzen und Bindungsanalysen verschiedener auf Matriptase-1 selektierter Einzelklone wurden schlussendlich die Miniproteinvarianten SOTI-III R4 EK6, MCoTI R3 EK2 und MCoTI R3 EK5 für eine detailliertere biochemische Charakterisierung ausgewählt. Diese sowie das Miniprotein MCoTI-II *wt* wurden chemisch synthetisiert, oxidativ gefaltet und aufgereinigt (Abb. 4.32).<sup>181,223</sup> Für die synthetisierten Inhibitoren ergaben sich ein- bis zweistellige nanomolare Inhibitionskonstanten (Tabelle 4.5). Aus der SOTI-III-Bibliothek konnte eine Variante mit einer zum Wildtyp umgekehrten Bioaktivität isoliert werden. Im Vergleich zum Ausgangsmolekül inhibiert diese Variante zwar Matriptase-1 jedoch kein Trypsin.

Die isolierten MCoTI-Varianten weisen einstellig nanomolare (R3 EK2) bis picomolare (R3 EK5) Inhibitionskonstanten auf (Tabelle 4.5). Bei EK5 ist wie im Fall des SOTI-III Inhibitors die Selektivität im Vergleich zum Wildtyp in Richtung Matriptase-1 verschoben. Hier ist jedoch kein vollständiger Aktivitätsverlust gegenüber Trypsin zu beobachten. EK2 weist demgegenüber ähnliche Inhibitionskonstanten für beide Proteasen auf und scheint somit weniger selektiv zu sein. Für eine detaillierte Analyse

---

der Spezifität bzw. Selektivität des affinsten Matriptase-1 Inhibitors wurde eine Selektivitätsstudie durchgeführt. Hierbei wurden apparente Inhibitionskonstanten für die Proteasen Thrombin, Urokinase und Hepsin ermittelt. Wie aus Abb. 4.35 hervorgeht konnte keine Inhibition der ausgewählten Enzyme festgestellt werden. Somit scheint die MCoTI-Variante R3 EK5 hochaffin und selektiv zu sein.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden niedermolekulare, peptidbasierte sowie Antikörperbasierte Matriptase-1 Inhibitoren publiziert, die teilweise hohe Affinitäten aufweisen, jedoch wurden bisher noch keine auf Cystinknoten basierten Matriptase-1 Inhibitoren mit den zuvor beschriebenen Eigenschaften dokumentiert.<sup>68,119,237,239</sup> Im Gegensatz zu Antikörpern verfügen Cystinknoten über einige Vorteile. Sie zeichnen sich durch hohe thermische, chemische und proteolytische Stabilität aus.<sup>168,174</sup>

Um die Art und Weise der Interaktion der isolierten Miniproteinvarianten mit der Protease zu untersuchen, hätten Co-Kristallisationsstudien der Proteaseinhibitoren erfolgen müssen. In anderen Studien konnte durch diese Verfahren die Interaktionen im Detail aufgeklärt werden.<sup>118,224,227,240</sup> Hierfür hätten jedoch präparative Mengen der Protease (> 10 mg) exprimiert, rückgefaltet und aufgereinigt werden müssen, was im Rahmen dieser Arbeit und des verwendeten Expressionssystems nicht möglich war. Durch Expressionsverfahren in anderen Wirtsorganismen wie z. B. *Pichia pastoris* könnte dies jedoch in nachfolgenden Arbeiten realisiert werden.<sup>94,240</sup>

Für den Nachweis der Bioaktivität der SOTI- und MCoTI-basierten Matriptase-1 Inhibitoren wurden Dosis-Wirkungs-Studien auf zellulärer Ebene durchgeführt. Hierbei differierten die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte um das 100-fache von den *in vitro* ermittelten Inhibitionskonstanten (Abb. 4.36). Dies ist möglicherweise auf die Regulation der Protease durch den natürlichen Inhibitor HAI-I und/oder die Versuchsbedingungen in Zellkultur zurückzuführen. Die Rolle des Inhibitors für die Regulation der Expression, die autokatalytische Aktivierung und Prozessierung humaner Matriptase-1 wurde bereits zuvor beschrieben.<sup>57,76,241,242</sup>

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass Cystinknoten für die Visualisierung von auf Tumoren exprimierten Biomarkern eingesetzt werden können.<sup>184,185,243</sup> So konnte beispielsweise ein Cystinknoten mit <sup>64</sup>Cu-DOTA konjugiert und Stabilität im Serum sowie Blut von Mäusen nachgewiesen werden.<sup>185</sup> Des Weiteren ist momentan das Spektrum tumorbindender Miniproteine auf integrinbindende Cystinknoten beschränkt.

Diese weisen RGD-Sequenzmotive in den an der Oberfläche exponierten Schleifen auf und binden so an die auf der Oberfläche von Krebszellen vorliegenden Integrine. Das Spektrum an Cystinknoten durch Matriptase-1 bindende Miniproteine zu erweitern, würde neue Möglichkeiten in der Tumordiagnostik eröffnen. So könnte die oberflächen-exponierte und enzymatisch aktive Protease, die nicht im Komplex mit HAI-I vorliegt, durch das hier vorgestellte Miniprotein detektiert werden. Im Gegensatz dazu können alle bisher kommerziell erhältlichen Antikörper, bis auf eine Ausnahme, nicht zwischen inaktiver und aktiver Form des Enzyms unterscheiden. Grund dafür ist, dass in der Regel Epitope adressiert werden, die nicht das aktive Zentrum flankieren oder durch proteolytische Aktivierung entstehen.<sup>244</sup> LeBeau *et al.* beschrieb 2013 einen rekombinanten, für das aktive Zentrum der Protease spezifischen Antikörper, der für die Visualisierung von Tumorepithelgewebe durch Infrarot- oder Einzel-Photonen-Emissions-Computertomographie genutzt werden kann. Dazu muss erwähnt werden, dass die aktive Form humaner Matriptase-1 ein karzinogener Biomarker ist.<sup>68</sup> Da Matriptase-1 eine wichtige Rolle in der Tumor-Progression sowie Invasivität spielt, könnten Cystinknoten, die spezifisch das aktive Zentrum der Protease adressieren, neuartige und nützliche Substanzen für die Tumordiagnostik sein. Des Weiteren könnten Informationen über die Aggressivität und Invasivität des Tumors ermittelt und so eine bessere Behandlung der Patienten ermöglicht werden.

Für einen abschließenden Vergleich ist in Tabelle 4.6 eine Übersicht bereits publizierter Inhibitoren der humanen Matriptase-1 mit den in dieser Arbeit isolierten dargestellt. Daraus geht hervor, dass mit dem in dieser Arbeit dargestellten Verfahren neuartige Inhibitoren (blau hinterlegt) isoliert werden können und diese hinsichtlich ihrer Affinität zu den besten derzeit bekannten Inhibitoren gehören (grau hinterlegt).

Tabelle 4.6: Übersicht einer Auswahl bekannter hochaffiner Matriptase-1 Inhibitoren

Struktur	Gruppe	Bezeichnung	K <sub>i</sub> [nM]
Small molecule	Steinmetzer <i>et al.</i> <sup>237</sup>	63	1,5
Peptid	Colombo <i>et al.</i> <sup>239</sup>	H-R-Q-A-R-Bt	0,011
	Fittler <i>et al.</i> <sup>119</sup>	44 (SDMI-2)	6,2
Cystinknoten	Quimbar <i>et al.</i> <sup>120</sup>	MCoTI-II V03R	0,29
	Glotzbach <i>et al.</i> <sup>223</sup>	MCoTI-II R3 EK5	0,8
	Glotzbach <i>et al.</i> <sup>223</sup>	SOTI-III R4 EK6	29
Antikörper	LeBeau <i>et al.</i> <sup>68</sup>	Fab A11	0,035

---

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung neuartiger, hochaffiner und selektiver Proteaseinhibitoren beschrieben. Hierfür wurden die Cystinknoten MCoTI-II und SOTI-III als Startmoleküle ausgewählt und die funktionelle Präsentation von SOTI-III auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* gezeigt. Die Präsentation erfolgt mit Hilfe des durch Boder und Wittrup entwickelten Aga1p/Aga2p-Systems und ermöglichte den direkten Nachweis des Inhibitor-Protease-Komplexes auf der Hefeoberfläche. Im Anschluss wurden Variantenbibliotheken der Miniproteine für die Isolierung neuartiger Proteaseinhibitoren erzeugt. Die Mutationen ausgewählter Aminosäuren sollten basierend auf den Strukturen der Miniproteine erfolgen. Da für SOTI-III bis zu diesem Zeitpunkt keine Struktur vorlag, wurde das Miniprotein im Komplex Trypsin kristallisiert. Anhand der Struktur des Miniproteins konnte anschließend die Zuordnung der Inhibitoren der *Mirabilis* Familie zur Gruppe der Cystinknoten bestätigt werden. Ferner erfolgte eine Klassifizierung der *Mirabilis*-Inhibitoren als neue Gruppe der Serinprotease Inhibitoren.

Für die Randomisierung der SOTI-III-Bibliothek wurde eine NNK-Randomisierung gewählt, wohingegen die Mutationen der MCoTI-Bibliotheken durch eine Codon-basierte Synthese in die Bibliothek eingeführt wurden. Die anschließend erstellten Miniproteinbibliotheken umfassten  $2 \cdot 10^7$  (MCoTI(SloI)-Bibliothek) bzw.  $2 \cdot 10^8$  (SOTI-III-Bibliothek) Varianten. Für eine Durchmusterung der Bibliotheken auf eine für die Tumordiagnostik relevante und als karzinogener Biomarker eingestufte Protease erfolgte die Expression der katalytischen Domäne der humanen Typ II transmembranen Serinprotease Matriptase-1 in Form von *inclusion bodies* in *E. coli*. Nach vier Selektionsrunden *via* FACS konnten aus beiden Bibliotheken durch Matriptase-1 markierte Hefepopulationen angereichert und Einzelklone analysiert sowie charakterisiert werden. Schließlich konnten eine SOTI-Variante mit einer Inhibitionskonstante von 29 nM sowie mehrere MCoTI-Varianten als Matriptaseinhibitoren identifiziert werden. Der affinste MCoTI-basierte Inhibitor weist neben einer picomolaren Inhibitionskonstante ( $K_i = 0,83$  nM) eine hohe Spezifität sowie Bioaktivität ( $IC_{50} = 0,21$   $\mu$ M) in Kultur einer Prostatakrebszelllinie (PC-3) auf. Daher könnten die hier isolierten und charakterisierten Cystinknoten Anwendung in der Tumordiagnostik und Therapie finden.

---

## 6 Anhang

### Vergleich des SOTI-III/Trypsin Co-Komplex mit bekannten Trypsininhibitoren

Für den Vergleich von Inhibitorstrukturen im Komplex mit Trypsin wurden alle bekannten Co-Kristallstrukturen der Proteindatenbank (PDB) entnommen. Die initiale Liste von 494 Strukturen wurde unter Verwendung der erweiterten Sucheinstellungen für Trypsin mit zwei oder mehr unterschiedlichen Peptidketten erzeugt. Alle Strukturen dieser Liste wurden anhand der Trypsinstrukturen mit der Peptidkette A des SOTI-III/Trypsin Co-Komplexes unter Verwendung von PyMol überlagert. Durch die Auswahl-Algebra des Programms wurden anschließend nur die Strukturen betrachtet, die das aktive Zentrum der Protease blockieren und in räumlicher Nähe ( $<3 \text{ \AA}$ ) zu den Resten 12-15 der Peptidkette D von SOTI-III vorliegen. Nach manueller Überprüfung und Auswahl verblieben die folgenden 99 Strukturen:

1AN1, 1AVW, 1AVX, 1BRC, 1BZX, 1C9P, 1C9T, 1C07, 1D6R, 1EJA, 1EJM, 1EJM, 1EJS, 1EZU, 1EZU, 1F2S, 1F7Z, 1G9I, 1H9H, 1H9I, 1K9O, 1LDT, 1MCT, 1OPH, 1OX1, 1P2I, 1P2J, 1P2K, 1PPE, 1SBW, 1SFI, 1SLV, 1SLW, 1SLX, 1SMF, 1TAB, 1TAW, 1TFX, 1TFX, 1TPA, 1YKT, 1YLC, 1YLD, 1Z7K, 1ZR0, 1ZR0, 2BTC, 2F3C, 2F91, 2FI3, 2FI4, 2FI5, 2FTL, 2FTM, 2G81, 2ILN, 2ILN, 2O9Q, 2PLX, 2PTC, 2QN5, 2QYI, 2RA3, 2RA3, 2STA, 2STB, 2TGP, 2TPI, 2UUY, 2XTT, 3BTD, 3BTE, 3BTF, 3BTG, 3BTH, 3BTK, 3BTM, 3BTQ, 3BTT, 3BTW, 3D65, 3FP6, 3FP7, 3FP8, 3I29, 3M7Q, 3MYW, 3MYW, 3OTJ, 3P92, 3RDZ, 3RDZ, 3TGI, 3TGJ, 3TGK, 3TPI, 4ABI, 4ABJ, 4TPI.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
CCK	zyklische Cystinknoten
CUB	Cls/Clr, <i>urchin embryonic growth factor</i> und <i>bone morphogenic protein-1</i> Domäne
d. h.	das heißt
DESC1	<i>differentially expressed squamous cell carcinoma</i> Gen 1
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EstA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Esterase
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Gerät) oder Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Verfahren)
FRZ	<i>frizzled</i> Domäne
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GFCK	Wachstumsfaktor-Cystinknoten
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HA	Hemagglutinin
HAI-I	<i>hepatocyte growth factor activator inhibitor-1</i>
HAT	<i>human airway trypsin-like</i> Protease
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
ICK	Inhibitor-Cystinknoten
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDLA	<i>low-density lipoprotein receptor domain class A</i>
M	Molekulargewicht (in g/mol)

---

MACS	<i>magnetic cell sorter</i> (Gerät) oder Magnetische Zellsortierung (Verfahren)
MAM	merpin, A5 <i>antigen</i> und <i>receptor protein phosphatase</i> $\mu$ Domäne
MCoTI-II	<i>Momordica cochinchinensis</i> Trypsininhibitor II
MSPL	<i>mosaic serine protease long-form</i>
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (-Puffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PET	<i>positron emission tomography</i>
RT	Raumtemperatur (~20°C)
SEA	<i>single sea urchin sperm</i> Protein
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SFTI-1	<i>sunflower trypsin inhibitor-I</i>
SOTI-III	<i>Spinacia oleracea</i> Trypsininhibitor III
SPD	Serinprotease Domäne
SPECT	<i>single-photon emission computed tomography</i>
SPI	Serinproteaseinhibitoren
SR	<i>scavenger rezeptor cystein-rich</i> Domäne
T	Thymin
TBE	Tris-Borate-EDTA(-Puffer)
TE	Tris-EDTA(-Puffer)
TMD	transmembrane Domäne
TTSP	Typ II transmembrane Serinproteasen
U	Uracil
uPA	Urokinase
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial cell growth factor</i>
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel



---

## 8 Literaturverzeichnis

1. Schwaiger, C. S., Liin, S. I., Elinder, F. & Lindahl, E. (2013). The conserved phenylalanine in the K<sup>+</sup> channel voltage-sensor domain creates a barrier with unidirectional effects. *Biophys. J.* **104**, 75-84.
2. Patel, S. K., Jackson, L., Warren, A. Y., Arya, P., Shaw, R. W. & Khan, R. N. (2013). A role for two-pore potassium (K2P) channels in endometrial epithelial function. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 134-146.
3. Nichols, A. S., Floyd, D. H., Bruinsma, S. P., Narzinski, K. & Baranski, T. J. (2013). Frizzled receptors signal through G proteins. *Cell. Signal.* **25**, 1468-1475.
4. Walker, F., Rothacker, J., Henderson, C., Nice, E. C., Catimel, B., Zhang, H. H., *et al.* (2012). Ligand binding induces a conformational change in epidermal growth factor receptor dimers. *Growth Factors* **30**, 394-409.
5. Song, G., Koksal, A. C., Lu, C. & Springer, T. A. (2012). Shape change in the receptor for gliding motility in Plasmodium sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 21420-21425.
6. Kamato, D., Burch, M. L., Osman, N., Zheng, W. & Little, P. J. (2013). Therapeutic implications of endothelin and thrombin G-protein-coupled receptor transactivation of tyrosine and serine/threonine kinase cell surface receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 465-473.
7. Pike, T., Widberg, C., Goodall, A., Payne, E., Giles, N., Hancock, J., *et al.* (2013). Truncated MEK1 is required for transient activation of MAPK signalling in G2 phase cells. *Cell. Signal.* **25**, 1423-1428.
8. Lee, H. & Hamilton, J. R. (2012). Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease. *Pharmacol. Ther.* **134**, 246-259.
9. Vu, T. K., Wheaton, V. I., Hung, D. T., Charo, I. & Coughlin, S. R. (1991). Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* **353**, 674-677.
10. Connolly, A. J., Ishihara, H., Kahn, M. L., Farese, R. V., Jr. & Coughlin, S. R. (1996). Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* **381**, 516-519.
11. Bono, F., Lamarche, I. & Herbert, J. M. (1997). Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 762-764.
12. Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M. & Bunnett, N. W. (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* **274**, C1429-1452.
13. Barnes, J. A., Singh, S. & Gomes, A. V. (2004). Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol. Cell. Biochem.* **263**, 227-239.
14. Hamilton, J. R. (2009). Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. *Blood Rev.* **23**, 61-65.
15. Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B. & Trejo, J. (2010). Signal transduction by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 191-203.

- 
16. Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1800-1814.
  17. Antao, C. M. & Malcata, F. X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 637-650.
  18. Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 709-724.
  19. Farady, C. J. & Craik, C. S. (2010). Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. *Chembiochem* **11**, 2341-2346.
  20. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**, D343-350.
  21. Khan, A. R. & James, M. N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* **7**, 815-836.
  22. Clardy, J., Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1541-1550.
  23. Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F. & Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2427-2444.
  24. Egeblad, M. & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174.
  25. Parr, C., Watkins, G., Mansel, R. E. & Jiang, W. G. (2004). The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 202-211.
  26. Choi, S. Y., Bertram, S., Glowacka, I., Park, Y. W. & Pohlmann, S. (2009). Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends Mol. Med.* **15**, 303-312.
  27. Uhland, K. (2006). Matriptase and its putative role in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2968-2978.
  28. Szabo, R., Hobson, J. P., List, K., Molinolo, A., Lin, C. Y. & Bugge, T. H. (2008). Potent inhibition and global co-localization implicate the transmembrane Kunitz-type serine protease inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 in the regulation of epithelial matriptase activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 29495-29504.
  29. Wong, G. W., Tang, Y., Feyfant, E., Sali, A., Li, L., Li, Y., *et al.* (1999). Identification of a new member of the tryptase family of mouse and human mast cell proteases which possesses a novel COOH-terminal hydrophobic extension. *J. Biol. Chem.* **274**, 30784-30793.
  30. Netzel-Arnett, S., Bugge, T. H., Hess, R. A., Carnes, K., Stringer, B. W., Scarman, A. L., *et al.* (2009). The glycosylphosphatidylinositol-anchored serine protease PRSS21 (testisin) imparts murine epididymal sperm cell maturation and fertilizing ability. *Biol. Reprod.* **81**, 921-932.
  31. Shipway, A., Danahay, H., Williams, J. A., Tully, D. C., Backes, B. J. & Harris, J. L. (2004). Biochemical characterization of prostasin, a channel activating protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 953-963.
  32. Caughey, G. H., Raymond, W. W., Blount, J. L., Hau, L. W., Pallaoro, M., Wolters, P. J., *et al.* (2000). Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the

- 
- chromosome 16p mast cell tryptase and prostatic gene families. *J. Immunol.* **164**, 6566-6575.
33. Netzel-Arnett, S., Hooper, J. D., Szabo, R., Madison, E. L., Quigley, J. P., Bugge, T. H., *et al.* (2003). Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 237-258.
  34. Antalis, T. M., Bugge, T. H. & Wu, Q. (2011). Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **99**, 1-50.
  35. Szabo, R. & Bugge, T. H. (2011). Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 213-235.
  36. Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P. & Antalis, T. M. (2001). Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* **276**, 857-860.
  37. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5857-5864.
  38. Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J. E., *et al.* (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **38**, D211-222.
  39. Gaboriaud, C., Gregory-Paaron, L., Teillet, F., Thielens, N. M., Bally, I. & Arlaud, G. J. (2011). Structure and properties of the Ca(2+)-binding CUB domain, a widespread ligand-recognition unit involved in major biological functions. *Biochem. J.* **439**, 185-193.
  40. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47.
  41. Blacklow, S. C. & Kim, P. S. (1996). Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 758-762.
  42. North, C. L. & Blacklow, S. C. (2000). Evidence that familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor cause limited local misfolding in an LDL-A module pair. *Biochemistry* **39**, 13127-13135.
  43. Khatri, I. A., Wang, R. & Forstner, J. F. (2003). SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-module cleavage, association of fragments and membrane targeting of rat intestinal mucin Muc3. *Biochem. J.* **372**, 263-270.
  44. Bork, P. & Patthy, L. (1995). The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci.* **4**, 1421-1425.
  45. Roszmusz, E., Patthy, A., Trexler, M. & Patthy, L. (2001). Localization of disulfide bonds in the frizzled module of Ror1 receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 18485-18490.
  46. Cadigan, K. M. & Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286-3305.
  47. Holm, D., Fink, D. R., Steffensen, M. A., Schlosser, A., Nielsen, O., Moeller, J. B., *et al.* (2013). Characterization of a novel human scavenger receptor cysteine-rich molecule SCART1 expressed by lymphocytes. *Immunobiology* **218**, 408-417.

- 
48. Cismasiu, V. B., Denes, S. A., Reilander, H., Michel, H. & Szedlacsek, S. E. (2004). The MAM (meprin/A5-protein/PTPmu) domain is a homophilic binding site promoting the lateral dimerization of receptor-like protein-tyrosine phosphatase mu. *J. Biol. Chem.* **279**, 26922-26931.
  49. Ishmael, F. T., Norcum, M. T., Benkovic, S. J. & Bond, J. S. (2001). Multimeric structure of the secreted meprin A metalloproteinase and characterization of the functional protomer. *J. Biol. Chem.* **276**, 23207-23211.
  50. Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R. G. & Strittmatter, S. M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* **21**, 1093-1100.
  51. Bugge, T. H., Antalis, T. M. & Wu, Q. (2009). Type II transmembrane serine proteases. *J. Biol. Chem.* **284**, 23177-23181.
  52. Takeuchi, T., Shuman, M. A. & Craik, C. S. (1999). Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11054-11061.
  53. Zhang, Y., Cai, X., Schlegelberger, B. & Zheng, S. (1998). Assignment1 of human putative tumor suppressor genes ST13 (alias SNC6) and ST14 (alias SNC19) to human chromosome bands 22q13 and 11q24-->q25 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **83**, 56-57.
  54. Tanimoto, H., Shigemasa, K., Tian, X., Gu, L., Beard, J. B., Sawasaki, T., *et al.* (2005). Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **92**, 278-283.
  55. Lee, S. L., Huang, P. Y., Roller, P., Cho, E. G., Park, D. & Dickson, R. B. (2010). Matriptase/epithin participates in mammary epithelial cell growth and morphogenesis through HGF activation. *Mech. Dev.* **127**, 82-95.
  56. Welman, A., Sproul, D., Mullen, P., Muir, M., Kinnaird, A. R., Harrison, D. J., *et al.* (2012). Diversity of matriptase expression level and function in breast cancer. *PLoS One* **7**, e34182.
  57. List, K., Haudenschild, C. C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S. M., Swaim, W., *et al.* (2002). Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene* **21**, 3765-3779.
  58. Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., *et al.* (2001). Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* **158**, 1301-1311.
  59. Shi, Y. E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M. E. & Dickson, R. B. (1993). Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**, 1409-1415.
  60. Lin, C. Y., Wang, J. K., Torri, J., Dou, L., Sang, Q. A. & Dickson, R. B. (1997). Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from human breast cancer cells. Monoclonal antibody production, isolation, and localization. *J. Biol. Chem.* **272**, 9147-9152.

- 
61. Takeuchi, T., Harris, J. L., Huang, W., Yan, K. W., Coughlin, S. R. & Craik, C. S. (2000). Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J. Biol. Chem.* **275**, 26333-26342.
  62. Lee, S. L., Dickson, R. B. & Lin, C. Y. (2000). Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 36720-36725.
  63. Bocheva, G., Rattenholl, A., Kempkes, C., Goerge, T., Lin, C. Y., D'Andrea, M. R., *et al.* (2009). Role of matriptase and proteinase-activated receptor-2 in nonmelanoma skin cancer. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1816-1823.
  64. Seitz, I., Hess, S., Schulz, H., Eckl, R., Busch, G., Montens, H. P., *et al.* (2007). Membrane-type serine protease-1/matriptase induces interleukin-6 and -8 in endothelial cells by activation of protease-activated receptor-2: potential implications in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 769-775.
  65. List, K. (2009). Matriptase: a culprit in cancer? *Future Oncol.* **5**, 97-104.
  66. Kobel, M., Kalloger, S. E., Boyd, N., McKinney, S., Mehl, E., Palmer, C., *et al.* (2008). Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med.* **5**, e232.
  67. Tsai, W. C., Chu, C. H., Yu, C. P., Sheu, L. F., Chen, A., Chiang, H., *et al.* (2008). Matriptase and survivin expression associated with tumor progression and malignant potential in breast cancer of Chinese women: tissue microarray analysis of immunostaining scores with clinicopathological parameters. *Dis. Markers* **24**, 89-99.
  68. LeBeau, A. M., Lee, M., Murphy, S. T., Hann, B. C., Warren, R. S., Delos Santos, R., *et al.* (2013). Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 93-98.
  69. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
  70. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
  71. Satomi, S., Yamasaki, Y., Tsuzuki, S., Hitomi, Y., Iwanaga, T. & Fushiki, T. (2001). A role for membrane-type serine protease (MT-SP1) in intestinal epithelial turnover. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 995-1002.
  72. Sun, L. F., Zheng, S., Shi, Y., Fang, X. M., Ge, W. T. & Ding, K. F. (2004). [SNC19/ST14 gene transfection and expression influence the biological behavior of colorectal cancer cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **84**, 843-848.
  73. Ding, K. F., Sun, L. F., Ge, W. T., Hu, H. G., Zhang, S. Z. & Zheng, S. (2005). Effect of SNC19/ST14 gene overexpression on invasion of colorectal cancer cells. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5651-5654.
  74. Ahmed, S., Jin, X., Yagi, M., Yasuda, C., Sato, Y., Higashi, S., *et al.* (2006). Identification of membrane-bound serine proteinase matriptase as processing enzyme of insulin-like growth factor binding protein-related protein-1 (IGFBP-rP1/angiomodulin/mac25). *FEBS J.* **273**, 615-627.



- 
75. List, K., Szabo, R., Wertz, P. W., Segre, J., Haudenschild, C. C., Kim, S. Y., *et al.* (2003). Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J. Cell Biol.* **163**, 901-910.
  76. Oberst, M. D., Williams, C. A., Dickson, R. B., Johnson, M. D. & Lin, C. Y. (2003). The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**, 26773-26779.
  77. Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A. & Dickson, R. B. (1999). Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 18231-18236.
  78. Oberst, M. D., Chen, L. Y., Kiyomiya, K., Williams, C. A., Lee, M. S., Johnson, M. D., *et al.* (2005). HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C462-470.
  79. Oberst, M. D., Johnson, M. D., Dickson, R. B., Lin, C. Y., Singh, B., Stewart, M., *et al.* (2002). Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin. Cancer Res.* **8**, 1101-1107.
  80. Tseng, I. C., Xu, H., Chou, F. P., Li, G., Vazzano, A. P., Kao, J. P., *et al.* (2010). Matriptase activation, an early cellular response to acidosis. *J. Biol. Chem.* **285**, 3261-3270.
  81. Takeuchi, T., Shuman, M. A. & Craik, C. S. (1999). Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11054-11061.
  82. Lee, M. S., Tseng, I. C., Wang, Y., Kiyomiya, K., Johnson, M. D., Dickson, R. B., *et al.* (2007). Autoactivation of matriptase in vitro: requirement for biomembrane and LDL receptor domain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C95-105.
  83. Otlewski, J., Krowarsch, D. & Apostoluk, W. (1999). Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* **46**, 531-565.
  84. Bateman, K. S. & James, M. N. (2011). Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Curr. Protein Pept. Sci.* **12**, 340-347.
  85. Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., *et al.* (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**, 33293-33296.
  86. Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., *et al.* (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO Journal* **9**, 1939-1947.
  87. Huntington, J. A., Read, R. J. & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923-926.
  88. Rydel, T. J., Ravichandran, K. G., Tulinsky, A., Bode, W., Huber, R., Roitsch, C., *et al.* (1990). The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science* **249**, 277-280.

- 
89. Huntington, J. A. & Carrell, R. W. (2001). The serpins: nature's molecular mousetraps. *Sci. Prog.* **84**, 125-136.
  90. Farady, C. J., Egea, P. F., Schneider, E. L., Darragh, M. R. & Craik, C. S. (2008). Structure of an Fab-protease complex reveals a highly specific non-canonical mechanism of inhibition. *J. Mol. Biol.* **380**, 351-360.
  91. Bode, W. & Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 241-252.
  92. Lu, W., Zhang, W., Molloy, S. S., Thomas, G., Ryan, K., Chiang, Y., *et al.* (1993). Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J. Biol. Chem.* **268**, 14583-14585.
  93. Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
  94. Zhao, B., Yuan, C., Li, R., Qu, D., Huang, M. & Ngo, J. C. (2013). Crystal structures of matriptase in complex with its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* **288**, 11155-11164.
  95. Huber, R. & Carrell, R. W. (1989). Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* **28**, 8951-8966.
  96. Loebermann, H., Tokuoka, R., Deisenhofer, J. & Huber, R. (1984). Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J. Mol. Biol.* **177**, 531-557.
  97. Galkin, A. V., Mullen, L., Fox, W. D., Brown, J., Duncan, D., Moreno, O., *et al.* (2004). CVS-3983, a selective matriptase inhibitor, suppresses the growth of androgen independent prostate tumor xenografts. *Prostate* **61**, 228-235.
  98. Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Sturzebecher, A., Donnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., *et al.* (2006). Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J. Med. Chem.* **49**, 4116-4126.
  99. Pabo, C. (1983). Molecular technology. Designing proteins and peptides. *Nature* **301**, 200.
  100. Ulmer, K. M. (1983). Protein engineering. *Science* **219**, 666-671.
  101. Bornscheuer, U. T. & Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 137-143.
  102. Guo, L. T., Helgadottir, S., Soll, D. & Ling, J. (2012). Rational design and directed evolution of a bacterial-type glutaminyl-tRNA synthetase precursor. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7967-7974.
  103. Blundell, T. L. (1994). Problems and solutions in protein engineering--towards rational design. *Trends Biotechnol.* **12**, 145-148.
  104. Regan, L. (1999). Protein redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 494-499.
  105. Hamilton, W. C. (1970). The revolution in crystallography. *Science* **169**, 133-141.



- 
106. Jardetzky, O. & Wade-Jardetzky, N. G. (1971). Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 605-634.
  107. Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (1989). The de novo design of protein structures. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 304-309.
  108. Goldstein, R. A., Luthey-Schulten, Z. A. & Wolynes, P. G. (1992). Optimal protein-folding codes from spin-glass theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4918-4922.
  109. Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
  110. Hult, K. & Berglund, P. (2003). Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 395-400.
  111. Tadokoro, T., Kazama, H., Koga, Y., Takano, K. & Kanaya, S. (2013). Investigating the Structural Dependence of Protein Stabilization by Amino Acid Substitution. *Biochemistry*.
  112. Schweiker, K. L. & Makhatadze, G. I. (2009). Protein stabilization by the rational design of surface charge-charge interactions. *Methods Mol. Biol.* **490**, 261-283.
  113. Kharitonov, A., Beals, J. M., Micanovic, R., Striffler, B. A., Rathnachalam, R., Wroblewski, V. J., *et al.* (2013). Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Candidate, LY2405319. *PLoS One* **8**, e58575.
  114. Musa, M., Lott, N., Laivenieks, M., Watanabe, L., Vieille, C. & Phillips, R. (2009). A single point mutation reverses the enantioselectivity of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase. *ChemCatChem* **1**, 89-93.
  115. Pire, C., Esclapez, J., Diaz, S., Perez-Pomares, F., Ferrer, J. & Bonete, M. (2009). Alteration of coenzyme specificity in halophilic NAD(P)<sup>+</sup> glucose dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Catal. B* **59**, 261-265.
  116. Empting, M., Avrutina, O., Meusinger, R., Fabritz, S., Reinwarth, M., Biesalski, M., *et al.* (2011). "Triazole bridge": disulfide-bond replacement by ruthenium-catalyzed formation of 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 5207-5211.
  117. Avrutina, O., Fittler, H., Glotzbach, B., Kolmar, H. & Empting, M. (2012). Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redox-stable SFTI-1 variants at near physiological pH. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 7753-7762.
  118. Tischler, M., Nasu, D., Empting, M., Schmelz, S., Heinz, D. W., Rottmann, P., *et al.* (2012). Braces for the peptide backbone: insights into structure-activity relationships of protease inhibitor mimics with locked amide conformations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 3708-3712.
  119. Fittler, H., Avrutina, O., Glotzbach, B., Empting, M. & Kolmar, H. (2013). Combinatorial tuning of peptidic drug candidates: high-affinity matriptase inhibitors through incremental structure-guided optimization. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 1848-1857.
  120. Quimbar, P., Malik, U., Sommerhoff, C. P., Kaas, Q., Chan, L. Y., Huang, Y. H., *et al.* (2013). High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *J. Biol. Chem.* DOI: 10.1074/jbc.M113.460030

- 
121. Wang, M., Si, T. & Zhao, H. (2012). Biocatalyst development by directed evolution. *Bioresour. Technol.* **115**, 117-125.
  122. Mills, D. R., Peterson, R. L. & Spiegelman, S. (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 217-224.
  123. Cirino, P. C., Mayer, K. M. & Umeno, D. (2003). Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* **231**, 3-9.
  124. Pritchard, L., Corne, D., Kell, D., Rowland, J. & Winson, M. (2005). A general model of error-prone PCR. *J. Theor. Biol.* **234**, 497-509.
  125. Barbas, C. F., 3rd, Bain, J. D., Hoekstra, D. M. & Lerner, R. A. (1992). Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4457-4461.
  126. Yin, C. C., Ren, L. L., Zhu, L. L., Wang, X. B., Zhang, Z., Huang, H. L., *et al.* (2008). Construction of a fully synthetic human scFv antibody library with CDR3 regions randomized by a split-mix-split method and its application. *J. Biochem.* **144**, 591-598.
  127. Van den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., *et al.* (2008). A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *BioTechniques* **45**, 340-343.
  128. Hu, H., Qian, J., Chu, J., Wang, Y., Zhuang, Y. & Zhang, S. (2009). DNA shuffling of methionine adenosyltransferase gene leads to improved S-adenosyl-L-methionine production in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **141**, 97-103.
  129. Chen, S., Qiu, J., Chen, C., Liu, C., Liu, Y., An, L., *et al.* (2012). Affinity maturation of anti-TNF-alpha scFv with somatic hypermutation in non-B cells. *Protein Cell* **3**, 460-469.
  130. Timms, A. R. & Bridges, B. A. (2002). DNA polymerase V-dependent mutator activity in an SOS-induced *Escherichia coli* strain with a temperature-sensitive DNA polymerase III. *Mutat. Res.* **499**, 97-101.
  131. Schaaper, R. M. (1988). Mechanisms of mutagenesis in the *Escherichia coli* mutator mutD5: role of DNA mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 8126-8130.
  132. Hertveldt, K., Belien, T. & Volckaert, G. (2009). General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* **502**, 321-339.
  133. Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.
  134. Lofblom, J. (2011). Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol. J.* **6**, 1115-1129.
  135. Daugherty, P. S. (2007). Protein engineering with bacterial display. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 474-480.
  136. Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. & Pluckthun, A. (1998). Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14130-14135.

- 
137. Hanes, J. & Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4937-4942.
  138. Valencia, C. A., Cotten, S. W., Dong, B. & Liu, R. (2008). mRNA-display-based selections for proteins with desired functions: a protease-substrate case study. *Biotechnol. Prog.* **24**, 561-569.
  139. Roberts, R. W. & Szostak, J. W. (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12297-12302.
  140. Boder, E. T. & Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**, 553-557.
  141. Kimura, R. H., Jones, D. S., Jiang, L., Miao, Z., Cheng, Z. & Cochran, J. R. (2011). Functional mutation of multiple solvent-exposed loops in the Ecballium elaterium trypsin inhibitor-II cystine knot miniprotein. *PLoS One* **6**, e16112.
  142. Bloom, J. D. & Arnold, F. H. (2009). In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106 Suppl 1**, 9995-10000.
  143. Turner, N. J. (2009). Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 567-573.
  144. Becker, S., Hobenreich, H., Vogel, A., Knorr, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., *et al.* (2008). Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 5085-5088.
  145. Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K. I., Yokoyama, S. & Hirao, I. (2013). Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat. Biotechnol.* DOI: 10.1038/nbt.2556.
  146. Dong, J., Sakurai, A., Nomura, N., Park, E. Y., Shibasaki, F. & Ueda, H. (2013). Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus. *PLoS One* **8**, e61158.
  147. Kawata, T. & Ogino, H. (2009). Enhancement of the organic solvent-stability of the LST-03 lipase by directed evolution. *Biotechnol. Prog.* **25**, 1605-1611.
  148. Eijsink, V. G., Gaseidnes, S., Borchert, T. V. & van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* **22**, 21-30.
  149. Doyon, J. B., Pattanayak, V., Meyer, C. B. & Liu, D. R. (2006). Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2477-2484.
  150. Gera, N., Hussain, M. & Rao, B. M. (2012). Protein selection using yeast surface display. *Methods*. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.03.014.
  151. Kondo, A. & Ueda, M. (2004). Yeast cell-surface display--applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 28-40.
  152. Chao, G., Lau, W. L., Hackel, B. J., Sazinsky, S. L., Lippow, S. M. & Wittrup, K. D. (2006). Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protoc.* **1**, 755-768.
  153. Wang, Z., Mathias, A., Stavrou, S. & Neville, D. M., Jr. (2005). A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. *Protein Eng. Des. Sel.* **18**, 337-343.

- 
154. Benatuil, L., Perez, J. M., Belk, J. & Hsieh, C. M. (2010). An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**, 155-159.
  155. Zhao, Q., Zhu, Z. & Dimitrov, D. S. (2012). Yeast display of engineered antibody domains. *Methods Mol. Biol.* **899**, 73-84.
  156. Gardner, B. M. & Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**, 1891-1894.
  157. Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M., Yeung, Y. A., *et al.* (2003). Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat. Biotechnol.* **21**, 163-170.
  158. Gera, N., Hussain, M., Wright, R. C. & Rao, B. M. (2011). Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold. *J. Mol. Biol.* **409**, 601-616.
  159. Pavor, T. V., Cho, Y. K. & Shusta, E. V. (2009). Development of GFP-based biosensors possessing the binding properties of antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11895-11900.
  160. Lee, C. H., Park, K. J., Sung, E. S., Kim, A., Choi, J. D., Kim, J. S., *et al.* (2010). Engineering of a human kringle domain into agonistic and antagonistic binding proteins functioning in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9567-9571.
  161. Lipovsek, D., Lippow, S. M., Hackel, B. J., Gregson, M. W., Cheng, P., Kapila, A., *et al.* (2007). Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies. *J. Mol. Biol.* **368**, 1024-1041.
  162. Reinwarth, M., Nasu, D., Kolmar, H. & Avrutina, O. (2012). Chemical synthesis, backbone cyclization and oxidative folding of cystine-knot peptides: promising scaffolds for applications in drug design. *Molecules* **17**, 12533-12552.
  163. Daly, N. L. & Craik, D. J. (2011). Bioactive cystine knot proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 362-368.
  164. Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J. C., Gracy, J., Chau, P. T., Ha, P. T., *et al.* (2004). Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **5**, 341-349.
  165. Kolmar, H. (2009). Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 608-614.
  166. Gelly, J. C., Gracy, J., Kaas, Q., Le-Nguyen, D., Heitz, A. & Chiche, L. (2004). The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. *Nucleic Acids Res.* **32**, D156-159.
  167. Gracy, J., Le-Nguyen, D., Gelly, J. C., Kaas, Q., Heitz, A. & Chiche, L. (2008). KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Res.* **36**, D314-319.
  168. Kolmar, H. (2011). Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 4329-4336.

- 
169. Heitz, A., Avrutina, O., Le-Nguyen, D., Diederichsen, U., Hernandez, J. F., Gracy, J., *et al.* (2008). Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. *BMC Struct. Biol.* **8**, 54.
  170. Werle, M., Kolmar, H., Albrecht, R. & Bernkop-Schnurch, A. (2008). Characterisation of the barrier caused by lumenally secreted gastro-intestinal proteolytic enzymes for two novel cystine-knot microproteins. *Amino Acids* **35**, 195-200.
  171. Craik, D. J., Daly, N. L. & Waine, C. (2001). The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* **39**, 43-60.
  172. Heitz, A., Hernandez, J. F., Gagnon, J., Hong, T. T., Pham, T. T., Nguyen, T. M., *et al.* (2001). Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic knottins. *Biochemistry* **40**, 7973-7983.
  173. Craik, D. J., Cemazar, M., Wang, C. K. & Daly, N. L. (2006). The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers* **84**, 250-266.
  174. Wang, C. K., Hu, S. H., Martin, J. L., Sjogren, T., Hajdu, J., Bohlin, L., *et al.* (2009). Combined X-ray and NMR analysis of the stability of the cyclotide cystine knot fold that underpins its insecticidal activity and potential use as a drug scaffold. *J. Biol. Chem.* **284**, 10672-10683.
  175. Avrutina, O., Schmoldt, H. U., Gabrijelcic-Geiger, D., Le Nguyen, D., Sommerhoff, C. P., Diederichsen, U., *et al.* (2005). Trypsin inhibition by macrocyclic and open-chain variants of the squash inhibitor MCoTI-II. *Biol. Chem.* **386**, 1301-1306.
  176. Williams, J. A., Day, M. & Heavner, J. E. (2008). Ziconotide: an update and review. *Expert Opin. Pharmacother.* **9**, 1575-1583.
  177. Tam, J. P., Lu, Y. A., Yang, J. L. & Chiu, K. W. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8913-8918.
  178. Gustafson, K. R., McKee, T. C. & Bokesch, H. R. (2004). Anti-HIV cyclotides. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 331-340.
  179. Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. & Anderson, M. (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10614-10619.
  180. Daly, N. L., Love, S., Alewood, P. F. & Craik, D. J. (1999). Chemical synthesis and folding pathways of large cyclic polypeptides: studies of the cystine knot polypeptide kalata B1. *Biochemistry* **38**, 10606-10614.
  181. Reinwarth, M., Glotzbach, B., Tomaszowski, M., Fabritz, S., Avrutina, O. & Kolmar, H. (2013). Oxidative folding of peptides with cystine-knot architectures: kinetic studies and optimization of folding conditions. *Chembiochem* **14**, 137-146.
  182. Austin, J., Wang, W., Puttamadappa, S., Shekhtman, A. & Camarero, J. A. (2009). Biosynthesis and biological screening of a genetically encoded library based on the cyclotide MCoTI-I. *Chembiochem* **10**, 2663-2670.
  183. Camarero, J. A., Kimura, R. H., Woo, Y. H., Shekhtman, A. & Cantor, J. (2007). Biosynthesis of a fully functional cyclotide inside living bacterial cells. *Chembiochem* **8**, 1363-1366.



184. Kimura, R. H., Cheng, Z., Gambhir, S. S. & Cochran, J. R. (2009). Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. *Cancer Res.* **69**, 2435-2442.
185. Jiang, L., Kimura, R. H., Miao, Z., Silverman, A. P., Ren, G., Liu, H., *et al.* (2010). Evaluation of a (64)Cu-labeled cystine-knot peptide based on agouti-related protein for PET of tumors expressing alphavbeta3 integrin. *J. Nucl. Med.* **51**, 251-258.
186. Silverman, A. P., Levin, A. M., Lahti, J. L. & Cochran, J. R. (2009). Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v)beta(3) integrin with antibody-like affinities. *J. Mol. Biol.* **385**, 1064-1075.
187. Reiss, S., Sieber, M., Oberle, V., Wentzel, A., Spangenberg, P., Claus, R., *et al.* (2006). Inhibition of platelet aggregation by grafting RGD and KGD sequences on the structural scaffold of small disulfide-rich proteins. *Platelets* **17**, 153-157.
188. Kolmar, H. (2010). Engineered cystine-knot miniproteins for diagnostic applications. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **10**, 361-368.
189. Meselson, M. & Yuan, R. (1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**, 1110-1114.
190. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
191. Rakestraw, J. A., Aird, D., Aha, P. M., Baynes, B. M. & Lipovsek, D. (2011). Secretion-and-capture cell-surface display for selection of target-binding proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 525-530.
192. Huang, Q. & Fu, W. L. (2005). Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **43**, 841-842.
193. Sharpless, N. E., Greenblatt, C. L. & Jennings, W. H. (1973). Therapeutic interference studies: mechanisms of interpolymer competition for dyes. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **35**, 187-195.
194. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
195. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
196. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., *et al.* (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
197. Taylor, M. S., Challed-Spong, A. & Johnson, E. A. (1997). Co-amplification of the amelogenin and HLA DQ alpha genes: optimization and validation. *J. Forensic Sci.* **42**, 130-136.
198. Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

- 
199. Meyer, T. S. & Lamberts, B. L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
  200. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145-149.
  201. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3116-3120.
  202. Swanson, J., Mayer, L. W. & Tam, M. R. (1982). Antigenicity of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane protein(s) III detected by immunoprecipitation and Western blot transfer with a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **38**, 668-672.
  203. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
  204. Tambourgi, D. V., Ogden, G. B., Hall, B. F., da Silva, W. D. & Kipnis, T. L. (1993). Biotinylation a fast and reproducible method for labelling *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins. *Trop. Med. Parasitol.* **44**, 91-94.
  205. Green, N. M. & Toms, E. J. (1970). Purification and crystallization of avidin. *Biochem. J.* **118**, 67-70.
  206. Mojsov, S. & Merrifield, R. B. (1984). An improved synthesis of crystalline mammalian glucagon. *Eur. J. Biochem.* **145**, 601-605.
  207. Brzozowski, K., Majewski, R., Jaskiewicz, A., Legowska, A., Klaudel, L., Rodziewicz-Motowidlo, S., *et al.* (2008). Conformational studies of [Abu(3, 11)]-SFTI-1, an analogue of the trypsin inhibitor isolated from sunflower seeds. *J. Pept. Sci.* **14**, 911-916.
  208. Barany, G. & Merrifield, R. B. (1977). A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 7363-7365.
  209. Porath, J. (1988). High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography* **443**, 3-11.
  210. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
  211. Chase, T., Jr. & Shaw, E. (1967). p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 508-514.
  212. Jameson, G. W., Roberts, D. V., Adams, R. W., Kyle, W. S. & Elmore, D. T. (1973). Determination of the operational molarity of solutions of bovine alpha-chymotrypsin, trypsin, thrombin and factor Xa by spectrofluorimetric titration. *Biochem. J.* **131**, 107-117.
  213. Pohlig, G., Fendrich, G., Knecht, R., Eder, B., Piechottka, G., Sommerhoff, C. P., *et al.* (1996). Purification, characterization and biological evaluation of recombinant leech-derived tryptase inhibitor (rLDTI) expressed at high level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **241**, 619-626.



- 
214. Bieth, J. G. (1980). Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16 Suppl**, 183-197.
215. Morrison, J. F. (1969). Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 269-286.
216. Kabsch, W. (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 133-144.
217. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674.
218. Adams, P. D., Gopal, K., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., *et al.* (2004). Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic structure determination. *J. Synchrotron Radiat.* **11**, 53-55.
219. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132.
220. Schrodinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99.
221. Kowalska, J., Pszczola, K., Wilimowska-Pelc, A., Lorenc-Kubis, I., Zuziak, E., Lugowski, M., *et al.* (2007). Trypsin inhibitors from the garden four o'clock (*Mirabilis jalapa*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seeds: isolation, characterization and chemical synthesis. *Phytochemistry* **68**, 1487-1496.
222. Modesti, M. & Kanaar, R. (2001). Homologous recombination: from model organisms to human disease. *Genome Biol.* **2**, REVIEWS1014.
223. Glotzbach, B., Reinwarth, M., Weber, N., Fabritz, S., Tomaszowski, M., Fittler, H., *et al.* (2013). Combinatorial optimization of cystine-knot peptides towards high-affinity inhibitors of human matriptase-1. *ChemBioChem*, under revision.
224. Glotzbach, B., Schmelz, S., Reinwarth, M., Christmann, A., Heinz, D. W. & Kolmar, H. (2013). Structural characterization of *Spinacia oleracea* trypsin inhibitor III (SOTI-III). *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **69**, 114-120.
225. Song, H. K. & Suh, S. W. (1998). Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* **275**, 347-363.
226. Luckett, S., Garcia, R. S., Barker, J. J., Konarev, A. V., Shewry, P. R., Clarke, A. R., *et al.* (1999). High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J. Mol. Biol.* **290**, 525-533.
227. Helland, R., Berglund, G. I., Otlewski, J., Apostoluk, W., Andersen, O. A., Willassen, N. P., *et al.* (1999). High-resolution structures of three new trypsin-squash-inhibitor complexes: a detailed comparison with other trypsins and their complexes. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **55**, 139-148.
228. Pasternak, A., White, A., Jeffery, C. J., Medina, N., Cahoon, M., Ringe, D., *et al.* (2001). The energetic cost of induced fit catalysis: Crystal structures of trypsinogen mutants with enhanced activity and inhibitor affinity. *Protein Sci.* **10**, 1331-1342.

229. Farady, C. J., Egea, P. F., Schneider, E. L., Darragh, M. R. & Craik, C. S. (2008). Structure of an Fab-protease complex reveals a highly specific non-canonical mechanism of inhibition. *J. Mol. Biol.* **380**, 351-360.
230. Reetz, M. T. & Carballeira, J. D. (2007). Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* **2**, 891-903.
231. Wentzel, A., Christmann, A., Kratzner, R. & Kolmar, H. (1999). Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the Ecballium elaterium trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* **274**, 21037-21043.
232. Heitz, A., Chiche, L., Le-Nguyen, D. & Castro, B. (1995). Folding of the squash trypsin inhibitor EETI II. Evidence of native and non-native local structural preferences in a linear analogue. *Eur. J. Biochem.* **233**, 837-846.
233. Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., el Hajji, M. & Castro, B. (1993). Characterization and 2D NMR study of the stable [9-21, 15-27] 2 disulfide intermediate in the folding of the 3 disulfide trypsin inhibitor EETI II. *Protein Sci.* **2**, 165-174.
234. Moore, S. J. & Cochran, J. R. (2012). Engineering knottins as novel binding agents. *Methods Enzymol.* **503**, 223-251.
235. Gould, A., Ji, Y., Aboye, T. L. & Camarero, J. A. (2011). Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 4294-4307.
236. Desilets, A., Longpre, J. M., Beaulieu, M. E. & Leduc, R. (2006). Inhibition of human matriptase by eglin c variants. *FEBS Lett.* **580**, 2227-2232.
237. Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Sturzebecher, A., Donnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., *et al.* (2006). Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J. Med. Chem.* **49**, 4116-4126.
238. Lahti, J. L., Lui, B. H., Beck, S. E., Lee, S. S., Ly, D. P., Longaker, M. T., *et al.* (2011). Engineered epidermal growth factor mutants with faster binding on-rates correlate with enhanced receptor activation. *FEBS Lett.* **585**, 1135-1139.
239. Colombo, É., Désilets, A., Duchêne, D., Chagnon, F., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. (2012). Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Matriptase. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 530-534.
240. Yuan, C., Chen, L., Meehan, E. J., Daly, N., Craik, D. J., Huang, M., *et al.* (2011). Structure of catalytic domain of Matriptase in complex with Sunflower trypsin inhibitor-1. *BMC Struct. Biol.* **11**, 30.
241. Yamasaki, Y., Satomi, S., Murai, N., Tsuzuki, S. & Fushiki, T. (2003). Inhibition of membrane-type serine protease 1/matriptase by natural and synthetic protease inhibitors. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **49**, 27-32.
242. Domoto, T., Takino, T., Guo, L. & Sato, H. (2012). Cleavage of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 by membrane-type MMP-1 activates matriptase. *Cancer Sci.* **103**, 448-454.
243. Jiang, L., Miao, Z., Kimura, R. H., Silverman, A. P., Ren, G., Liu, H., *et al.* (2012). <sup>111</sup>In-labeled cystine-knot peptides based on the Agouti-related protein for targeting tumor angiogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 368075.

- 
244. Ganesan, R., Eigenbrot, C. & Kirchhofer, D. (2010). Structural and mechanistic insight into how antibodies inhibit serine proteases. *Biochem. J.* **430**, 179-189.

---

### **III. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die an dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Harald Kolmar für die Bereitstellung des interessanten Themas, der Möglichkeit zur Fertigung dieser Arbeit in seiner Abteilung, die umfassende Betreuung und die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Siegfried Neumann für die Übernahme des Korreferats und der anregenden wissenschaftlichen Gespräche.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Andreas Christmann für die wissenschaftlichen Diskussionen, Hilfestellungen und die Korrektur der vorliegenden Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Dr. Olga Avrutina für die Unterstützung während der Promotion und den Verbesserungen der Publikationen. Insbesondere danke ich Dr. Stefan Schmelz für die Verwirklichung eines kleinen Nebenprojektes (SOTI-III Kristallstruktur), die Hilfe bei verschiedenen wissenschaftlichen Problemstellungen sowie den netten Gesprächen.

Janine Fritz, Tim Heiseler, Alexander Maaß, Franziska Maaß, Niklas Weber und allen noch verbliebenen Doktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für die wachsende Freundschaft und die interessanten wissenschaftlichen sowie privaten Gespräche. Ebenfalls danke ich Thomas Hofmeyer, der für Diskussionen, Ablenkung und Hilfe als Freund während der gesamten Zeit immer zur Verfügung stand. Ebenfalls möchte ich Michael Reinwarth danken, ohne den die Synthese und Faltung der Miniproteine nicht möglich gewesen wäre. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern, Technischen Angestellten und Diplomanden des Arbeitskreises für die gute Arbeitsatmosphäre und kollegiale Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich Marko Trabert für die Korrektur meiner Arbeit, den freundschaftlichen Rat sowie den geistigen Beistand während und insbesondere am Ende meiner Doktorarbeit danken. Meiner Freundin Christina, meinen Brüdern sowie meinen Freunden danke ich für die stetige moralische Unterstützung und die zu gegebener Zeit ermöglichte Ablenkung während und im Verlauf meiner Doktorarbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern von Herzen, dass sie mir über Jahre durch kompromisslose Unterstützung und geistigen Beistand meine Doktorarbeit ermöglicht und niemals an mir gezweifelt haben. Ohne Sie wäre das nicht möglich gewesen!



---

#### **IV. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Darmstadt, den 07.05.2013

---

Bernhard Glotzbach



---

## **V. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, den 07.05.2013

---

Bernhard Glotzbach

---

## VI. Lebenslauf

Name: Bernhard Glotzbach

Geburtsdatum: 05.09.1984

Geburtsort: Suhl

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung:

8/1995 – 6/2003 Abitur am Staatlichen Gymnasium Vacha

10/2003 – 10/2009 **Diplomstudium** im Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

Gesamtnote 1.18

9/2006 – 3/2007 **Auslandsstudium** an der „Universita degli Studi di Milano“ (Mailand / Italien) mit Fokus auf Biochemie und Biotechnologie

Fünfmönatiges Praktikum in der Gruppe von Prof. Dr. Anna Moroni.

01/2009 – 10/2009 **Diplomarbeit** am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt in der Gruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar

Thema der Diplomarbeit: „Präsentation eines Cystin-Knoten-Miniproteins und davon abgeleiteten Variantenbibliotheken auf der Oberfläche von Bakterien (*E. coli*) und Bakteriophagen“

11/2009 – 06/2013 **Doktorarbeit** am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt in der Gruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar

Thema der Arbeit: „Isolierung und Charakterisierung hochaffiner Cystin-Knoten-basierter Inhibitoren der humanen Protease Matriptase-1“

Darmstadt, den 07.05.2013

---

Bernhard Glotzbach